

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

**Obtención de un alimento potencialmente funcional a base de
harina de sorgo germinado y su relación con la actividad de la
enzima β -1,4 endoxilanas**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

LNH Alan Amado Ruiz Hernández

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**

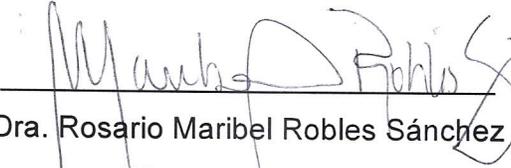


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

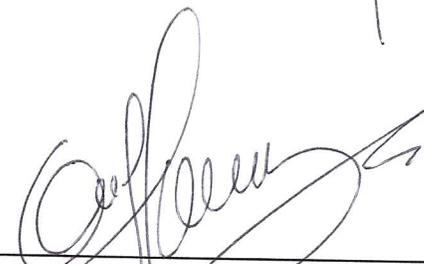
APROBACIÓN

Obtención de un alimento potencialmente funcional a base de harina de sorgo germinado y su relación con la actividad de la enzima β -1,4 endoxilanas

LNH. Alan Amado Ruiz Hernández

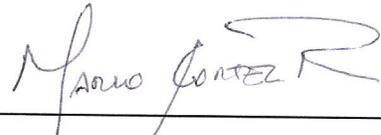


Dra. Rosario Maribel Robles Sánchez
Directora de Tesis



Dr. José Luis Cárdenas López

Sinodal



Dr. Mario Onofre Cortez Rocha

Sinodal



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar

Sinodal

Hermosillo, Sonora

Agosto, 2019

Hermosillo, Sonora a 5 de septiembre del 2019.

Asunto: Cesión de derechos

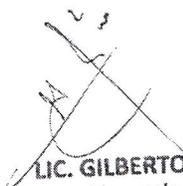
**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada "Obtención de un alimento potencialmente funcional a base de harina de sorgo germinado y su relación con la actividad de la enzima β -1,4 endoxilanasas", en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Maestro en Ciencias, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA



Alan Amado Ruiz Hernández

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por brindar las facilidades para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, por permitirme desarrollar en sus instalaciones mi proyecto de tesis.

A mi Directora de Tesis, Dra. Rosario Maribel Robles Sánchez que me escuchó, orientó y por todo lo que me enseñó para lograr desarrollar la tesis de maestría.

A los sinodales, Dr. Mario Onofre Cortez Rocha, Dr. José Luis Cárdenas y Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar quienes estudiaron, analizaron y recomendaron las mejores vías de desarrollo de la tesis.

A mis maestros, quienes que me orientaron y me dieron las herramientas necesarias para lograr el mejor desempeño académico.

A mis compañeros de clase, que gracias a su apoyo fue mucho más ameno el paso por el posgrado.

A mi novia Francylli, que me escuchó, apoyó y comprendió los sacrificios que realizaba durante mis estudios.

A Dr. Tito Ramón Rentería, que me motivó y orientó para llevar a cabo estudios de posgrado.

DEDICATORIA

A mis abuelos Socorro, Adán, Elena y Guadalupe, por todo su cariño, risas y apoyo durante todo mi desarrollo profesional.

A mis padres Leonor y Amado que me apoyaron, escucharon y aconsejaron todo el tiempo.

A mi hermana Gina, que ha sido incondicional ante todas mis decisiones.

A todas mis tías, por apoyarme, durante todo mi desarrollo profesional.

A mi tía Lupita Hernández, por sus palabras, por su ejemplo, por su fe hacia mi persona.

A mis mascotas, por recibirme con tanta alegría después de una larga jornada de trabajo.

RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades como la diabetes, enfermedades coronarias y ciertos tipos de cáncer. En ciertas etapas de estas enfermedades, se ha reportado que el estrés oxidativo juega un papel importante. El sorgo, uno de los cereales con mayor cantidad de compuestos bioactivos y actividad antioxidante puede ser una opción viable para el desarrollo de alimentos que contrarresten el estrés oxidativo y es debido a esto, que se le han venido aplicando algunas tecnologías con el fin de incrementar su potencial antioxidante. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo un estudio de optimización del proceso de germinación en sorgo para la máxima obtención de compuestos fenólicos. Mediante la metodología de superficie respuesta, se encontró que a 35°C y 28h de germinación el contenido de fenoles y ácido ferúlico aumentó hasta 181%, y 243% respectivamente, mientras que 33.6°C y 28h y 27.4°C y 28h fueron las condiciones de germinación para la máxima actividad antioxidante (DPPH +66% y TEAC +37%) lo anterior en relación a sorgo sin germinar. Derivado del establecimiento de las condiciones óptimas de germinación del sorgo se evaluó la asociación entre contenido de ácido ferúlico y actividad de la enzima β -1,4 endoxilanasas. Se demostró que a temperaturas menores a 35°C la actividad de la enzima fue mayor a la del sorgo sin germinar ($p < 0.05$; 0.87 $\mu\text{mol XylX6}/\text{min}$ vs 0.57 unidades XylX6/min). Cuando se incrementó la temperatura de germinación a 35°C, la actividad de la enzima fue estadísticamente igual a la del sorgo sin germinar, lo que hace suponer que esta presenta su acción degradativa antes de que se presente liberación o síntesis de *novos* de compuestos fenólicos. Los resultados de la evaluación de bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos presentes en el sorgo germinado, mostraron que estos compuestos fenólicos fueron hasta 1.7 veces más bioaccesibles que los del sorgo sin germinar, mientras que para el ácido ferúlico en la harina germinada fue hasta 11.7 veces más alta. Estos resultados estuvieron directamente asociados con actividad antioxidante. Lo anterior dio lugar para el diseño de un alimento con potencial funcionalidad biológica a base de harina germinada de sorgo optándose por la preparación de un cereal para desayuno tipo crema de sorgo, el cual resultó con mejor contenido de compuestos fenólicos y

actividad antioxidante comparado con sorgo sin germinar y con otros productos comerciales de preparación similar. Como conclusión de este estudio se puede establecer que la germinación de sorgo por 28 h a 35°C mejora su potencial biológico e incrementa la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y ácido ferúlico. Futuros estudios pueden ser enfocados hacia el uso de sorgo germinado como parte de dietas saludables.

CONTENIDO

APROBACIÓN	i
DERECHOS DE AUTOR	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xii
INTRODUCCIÓN	13
ANTECEDENTES	16
Generalidades del Sorgo	16
Producción Mundial	16
Consumo Mundial	16
Composición Química y Anatómica del Grano de Sorgo	18
Compuestos Bioactivos del Sorgo	19
Ácidos fenólicos	21
Tecnologías Aplicadas en el Sorgo para Mejorar el Contenido de Ácidos Fenólicos	23
Germinación	24
Fase I: Imbibición	26
Fase II: Activación Metabólica o Germinación	27
Fase III: Crecimiento de la Radícula.	28
Mecanismos de Síntesis y Degradación de Compuestos Fenólicos	28
Reciclaje de las Paredes Celulares Ricas en Ácidos Fenólicos	29
Síntesis de <i>novo</i> de Ácidos Fenólicos	31
Variables Involucradas en el Proceso de Germinación en Granos	33
Sanitización	34
Estrés salino	35
Remojo	36
Fotoperiodo	36
Temperatura	38

Germinación Asociada a Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante	38
Sistemas Antioxidantes en las Plantas	40
Germinación en Cereales para el Mejoramiento del Contenido de Compuestos Fenólicos.....	42
Bioaccesibilidad de Compuestos Bioactivos de Granos Germinados	45
Alimentos Funcionales.....	45
HIPÓTESIS	48
OBJETIVOS	49
Objetivo General.....	49
Objetivos Específicos.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS	50
Obtención y Preparación de la Muestra.....	50
Procedimiento de Germinación	50
Obtención de Extractos Metanólicos y Alcalinos.....	51
Determinación de Fenoles Totales	52
Cuantificación de Ácido Ferúlico por UHPLC-DAD.....	52
Actividad Antioxidante	52
Extracción y Evaluación de la Actividad de la Enzima β 1,4 Endoxilanasas	53
Cálculo de la Actividad Enzimática.....	54
Simulación de la Digestión Gastrointestinal <i>in vitro</i>	55
Fase oral	55
Fase gástrica.....	55
Fase intestinal	57
Diseño de un Alimento con Potencial Funcionalidad Biológica	57
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
Optimización de las Condiciones de Germinación de Sorgo y su Influencia sobre el Contenido de Fenoles Libres y Actividad Antioxidante	63
Actividad de β -1,4 Endoxilanasas y su Relación con el Contenido de Ácido Ferúlico.....	74
Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos.....	78
Bioaccesibilidad del Ácido Ferúlico	81
Capacidad Antioxidante.....	84

Diseño de un Alimento con Potencial Funcionalidad Biológica	87
CONCLUSIONES	94
RECOMENDACIONES	95
REFERENCIAS	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Principales países productores de sorgo (2006-2017).....	17
2	Principales países consumidores de sorgo, 2006/07 - 2016/17.....	18
3	Estructura física del grano de sorgo.....	20
4	Curso temporal de eventos físicos y metabólicos que ocurren durante la germinación (Fases I y II) y crecimiento temprano de la plántula (Fase III).....	25
5	Vías metabólicas de reciclaje para los principales polisacáridos primarios de pared celular.....	32
6	Ruta de la síntesis de <i>novo</i> de ácidos fenólicos.....	33
7	Diagrama general de la simulación gastrointestinal <i>in vitro</i>	57
8	Efecto del tiempo de remojo sobre la germinación de granos de sorgo.	61
9	Fenoles totales libres en diferentes tiempos de remojo.....	61
10	Efecto del tiempo de remojo en sorgo, sobre la actividad antioxidante medida por DPPH.....	62
11	Superficie respuesta para la concentración de fenoles totales libres, expresados como mg EAG/g en función del tiempo y temperatura en el grano de sorgo.....	71
12	Superficie respuesta para la concentración de ácido ferúlico, expresado como μg ácido ferúlico/g en función del tiempo y temperatura en el grano de sorgo.....	71
13	Superficie respuesta para la actividad antioxidante medida por DPPH en extractos metanólicos (fenoles libres), expresados como μm ET/g en función del tiempo y temperatura de germinación en el grano de sorgo.....	72
14	Superficie respuesta para la actividad antioxidante (TEAC), expresada como μm ET/g en función del tiempo y temperatura de germinación en el grano de sorgo.....	72

15	Zona de convergencia de gráficos de contorno de variables de respuesta en función del tiempo y temperatura de germinación.....	73
16	Efecto del tiempo y temperatura de germinación sobre la actividad de β -1,4 endoxilanasas.....	75
17	Actividad antioxidante por DPPH (μ mET/g) de muestra durante el proceso de digestión <i>in vitro</i> en sorgo germinado comparado con sorgo no germinado.....	85
18	Actividad antioxidante por TEAC (μ mET/g) durante el proceso de digestión <i>in vitro</i> en sorgo germinado comparado con sorgo no germinado.....	86
19	Contenido de fenoles totales libres en cremas de harina de sorgo germinado y no germinado comparado con cremas comerciales de cereal de trigo y maíz.....	88
20	Actividad antioxidante por DPPH en cremas comerciales y de sorgo germinado y sin germinar.....	89
21	Actividad antioxidante por TEAC en cremas comerciales y de sorgo germinado y sin germinar.....	90

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Composición química proximal del grano de sorgo entero y sus fracciones.....	19
2	Principales fitoquímicos presentes en los cereales de mayor consumo.....	21
3	Procesos tecnológicos aplicados al sorgo	24
4	Efecto del proceso de remojo y germinación sobre el contenido fenólico.....	36
5	Efecto del proceso de remojo y germinación sobre la capacidad secuestrante del radical DPPH (%)......	37
6	Principales características de la germinación en sorgo y otros cereales.....	44
7	Condiciones experimentales con diferentes tiempos y temperaturas de germinación de sorgo	59
8	Efecto de los factores combinados de tiempo y temperatura de germinación de sorgo sobre fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante de las fracciones libres y ligadas.....	64
9	Coeficientes de regresión de la ecuación polinomial cuadrática para fenoles totales libres y actividad antioxidante	66
10	Ecuaciones de predicción para las diferentes variables respuesta.....	67
11	Comparación entre el valor predicho y el valor experimental para FTL, AF, DPPH y TEAC.....	68
12	Contenido de fenoles totales (mg EAG/g) en cada una de las fases de digestión <i>in vitro</i> de sorgo germinado comparado con sorgo no germinado.....	78
13	Contenido de ácido ferúlico libre durante el proceso de digestión <i>in vitro</i> en sorgo germinado comparado con sorgo no germinado.....	83
14	Efecto de la cocción de harina de sorgo germinada y sin germinar en el contenido de compuestos fenólicos, ácido ferúlico y actividad antioxidante.....	91

INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo, lo que pudiera conducir a una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares (cardiopatías y accidentes cardiovasculares), diabetes y algunos tipos de cáncer (OMS, 2017).

En 2016, alrededor de 1,900 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos. Así mismo, 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos. También había más de 340 millones de niños y adolescentes con sobrepeso u obesidad (OMS, 2017).

En México, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en adultos pasó de 71.2% en 2012 a 72.5% en 2016, en adolescentes de entre 12 y 19 años la prevalencia fue de 36.3%, superior a la prevalencia en 2012 (34.9%), mientras que en la población de 5 a 11 años disminuyó de 34.4% en 2012 a 33.2% en 2016 (ENSANUT, 2016).

Diversos estudios clínicos, epidemiológicos y experimentales han demostrado que la dieta puede jugar un papel importante en la prevención y tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades (Swinburn y col., 2004; Hill y Peters y col., 1998; Cecchini y col., 2010; de Git y Adan, 2015). Particularmente, se ha demostrado que el consumo regular de cereales integrales reduce el riesgo de enfermedad cardíaca y diabetes entre un 20-30% (Flight y Clifton, 2006; NHMCR, 2013), mejora la regulación de la glucosa en la sangre y el control del peso (Sahyoun y col., 2006), y disminuye el riesgo de ciertos tipos de cáncer (Venn y Mann, 2004; Williams y col., 2008).

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) ocupa el cuarto lugar en producción de cereales a nivel mundial, forma parte de la dieta de muchos países africanos y asiáticos, Además de su aporte energético y nutricional, ha demostrado ser una excelente fuente de compuestos bioactivos que pueden promover beneficios para salud humana. Los resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los compuestos aislados del sorgo, principalmente fenólicos, promueven cambios benéficos en los parámetros

relacionados con enfermedades no transmisibles como la obesidad, la diabetes, la dislipidemia, las enfermedades cardiovasculares, cáncer e hipertensión (Awika y col., 2009; Farrar y col., 2008; Kamath y col., 2007; Kim y Park, 2012; Moraes y col., 2012; Muriu y col., 2002; Shih y col., 2007; Woo y col., 2012; Yang y col., 2009; De Morais Cardoso y col., 2015).

La biodisponibilidad de compuestos fenólicos como el ácido ferúlico en los granos de cereales está determinada por su accesibilidad (Anson y col., 2009a), y absorción, distribución en los tejidos y bioactividad (Anson y col., 2009a; Zhao y Moghadasian, 2009), por lo que resulta imprescindible mejorar su accesibilidad por medio de algún procedimiento previo a su ingesta, ya que estos compuestos se pueden encontrar de forma libre, ligada y conjugada mayoritariamente en el salvado de los cereales (Adom y col., 2005; Hemery y col., 2007; Shahidi y Naczk, 1995).

En los últimos años ha cobrado gran interés la aplicación de tecnologías en sorgo con el fin de mejorar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos, entre estas destacan el remojo (Wu y col., 2013a; Afify y col., 2012a), calor húmedo (Towo y col., 2006; N'Dri y col., 2013; Cardoso y col., 2014; Wu y col., 2013a; Hithamani y Srinivasan, 2014a), extrusión (Dlamini y col., 2007; De Morais Cardoso y col., 2015), fermentación (Dlamini y col., 2007; Towo y col., 2006; Zaroug y col., 2014), microondas (Cardoso y col., 2014; Hithamani y Srinivasan, 2014a), germinación (Dicko y col., 2005; Donkor y col., 2012; Hithamani y Srinivasan, 2014a), tostado y cocción a presión (Hithamani y Srinivasan, 2014a).

De entre estos procesos, la germinación ha sido poco estudiada desde un enfoque de mejoramiento de compuestos bioactivos. Algunos estudios han demostrado que el tiempo de germinación y temperatura pudieran ser factores importantes en la promoción del incremento de compuestos fenólicos (Dicko y col., 2005; Donkor y col., 2012; Subramanian y col., 1992). Dado que la germinación es un proceso biológico en la que se involucran diversos aspectos bioquímicos, pudiera sugerirse que durante el proceso se presenta la activación de enzimas hidrolíticas particularmente con actividad xilanasa, la cuales pudieran promover la liberación de compuestos fenólicos

ligados a cadenas de xilanos (arabinoxilanos) (Dornez y col., 2009), o bien, es posible que se presente la síntesis de *novoo* de compuestos fenólicos útiles para la germinación de la nueva planta (Wang y Chen, 2014).

Diversos estudios han demostrado variaciones en el contenido de los compuestos fenólicos durante la germinación de algunas variedades de sorgo (Nwanguma y Eze, 1996; Subramanian y col., 1992; Dicko y col., 2005). Los contenidos pueden ser de amplia variación no sólo entre especies vegetales, sino incluso entre cultivos de una misma especie, dependiendo tanto de características genéticas como de situaciones de estrés (plagas, herbívoros, luz ultravioleta) y factores ambientales (Bravo, 1998).

A la fecha no existen estudios de optimización del proceso de germinación en grano de sorgo que involucren compuestos fenólicos como variable respuesta, así como tampoco han sido abordados mecanismos que relacionen a los compuestos fenólicos con actividad de enzimas durante el proceso.

Los productos de granos germinados han adquirido gran interés por parte del consumidor en los últimos años particularmente por su gran valor nutricional, pero además por su aporte en componentes bioactivos que pueden mediar en el tratamiento y prevención de enfermedades crónico-degenerativas.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este estudio fue obtener un alimento con potencial biológico mediante la optimización del proceso de germinación de grano de sorgo con alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, así como de establecer una posible relación con actividad de enzima β -1,4 endoxilanasas.

ANTECEDENTES

Generalidades del Sorgo

El sorgo (*Sorghum spp.*) pertenece a la familia de las *Poaceae* o gramíneas oriundas de las regiones tropicales y subtropicales de África oriental. Se cultiva en sus zonas de origen, tanto en Europa como en América y Asia como un cereal para consumo humano y para la producción de forrajes, así como también para la elaboración de bebidas alcohólicas. Su resistencia a la sequía y al calor permite su crecimiento en regiones áridas, y es uno de los cultivos alimentarios más importantes del mundo (Rao y col., 2014).

En estas regiones es un importante contribuyente en las dietas básicas de las poblaciones locales (Taylor y col., 2006), en cambio, en países como Australia y Estados Unidos, su principal uso es como alimento para el ganado y más recientemente en la producción de biocombustibles (Stefoska y col., 2015).

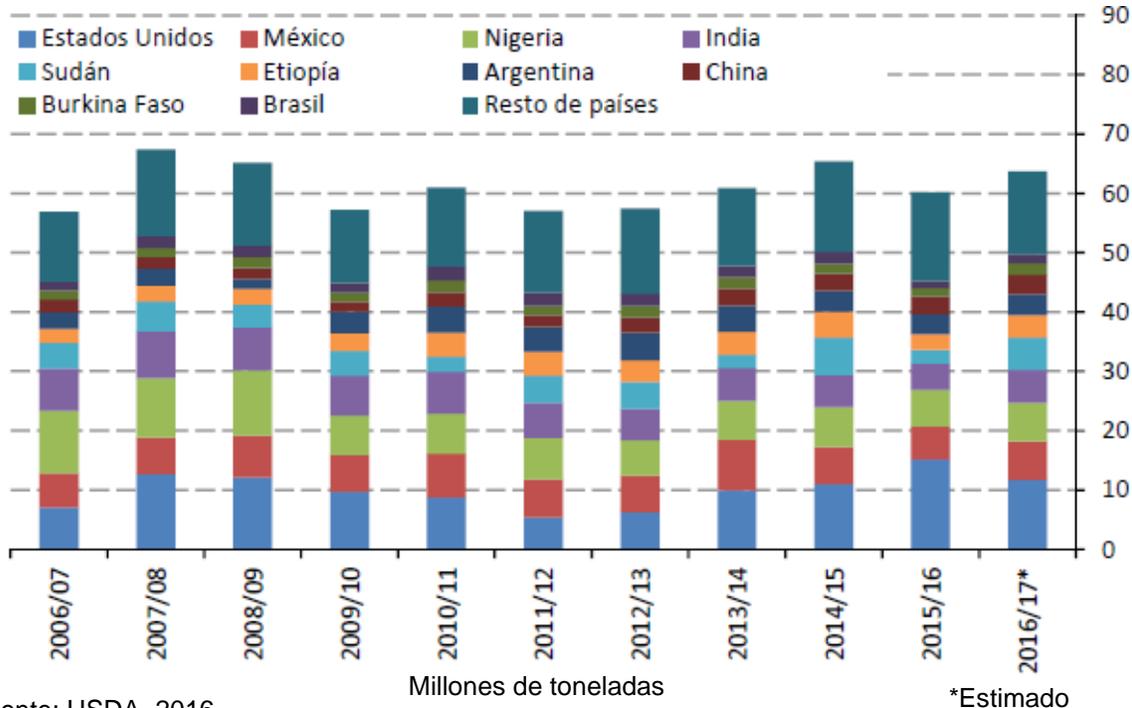
Producción Mundial

En el ciclo 2016/17, de acuerdo con la Figura 1, el 73% de la producción mundial de sorgo se concentró en ocho países: Estados Unidos, que participó con el 18% del total; Nigeria y México con alrededor de 10% cada uno; Sudán e India, con una participación cercana al 9% y con menores participaciones se encontraban Etiopía, Argentina y China (FIRA, 2016).

Consumo Mundial

El consumo mundial de sorgo ha mostrado una tendencia creciente en los últimos 10 años (Figura 2). Durante los ciclos del 2006/07 al 2015/16, se ha registrado un crecimiento de 0.7 % la tasa media anual. China ha sido uno de los países que ha venido incrementando el consumo de sorgo de manera significativa en los últimos diez años, mientras que México, Argentina e India se han mantenido con consumos

constantes. La producción mundial de sorgo se distribuye en sorgo forrajero (consumo animal) y sorgo para consumo humano. En la cosecha del ciclo 2016/2017 se produjeron alrededor de 65 millones de toneladas, de las cuales 36 millones fueron destinadas a consumo humano, destacando Sudán, India, Etiopía y Estados Unidos.



Fuente: USDA, 2016

*Estimado

Figura 1. Principales países productores de sorgo (2006-2017)

El sorgo, sin embargo, es un alimento básico esencial en muchas partes del mundo en desarrollo, especialmente en las zonas más áridas y marginales de los trópicos semiáridos. Su consumo como alimento es más estable y mucho más elevado en las zonas productoras rurales que en los núcleos urbanos. Dentro de las zonas rurales, el consumo tiende a ser mayor en las regiones más pobres. Donde la prevalencia de inseguridad alimentaria es muy alta. El sorgo se consume en formas diversas que varían de una región a otra. En general, se consume como grano entero o como harina, con la que se preparan platos tradicionales. Existen básicamente cuatro alimentos elaborados a base de sorgo: pan plano, generalmente sin levadura y

preparado con masa fermentada o sin fermentar mayormente consumido en Asia y en algunas partes de África; Gachas consistentes o delgadas, fermentadas o sin fermentar, que se consumen principalmente en África; productos cocidos similares a los que se preparan con sémola de maíz o con arroz y preparados fritos en aceite (FAO, 1997).

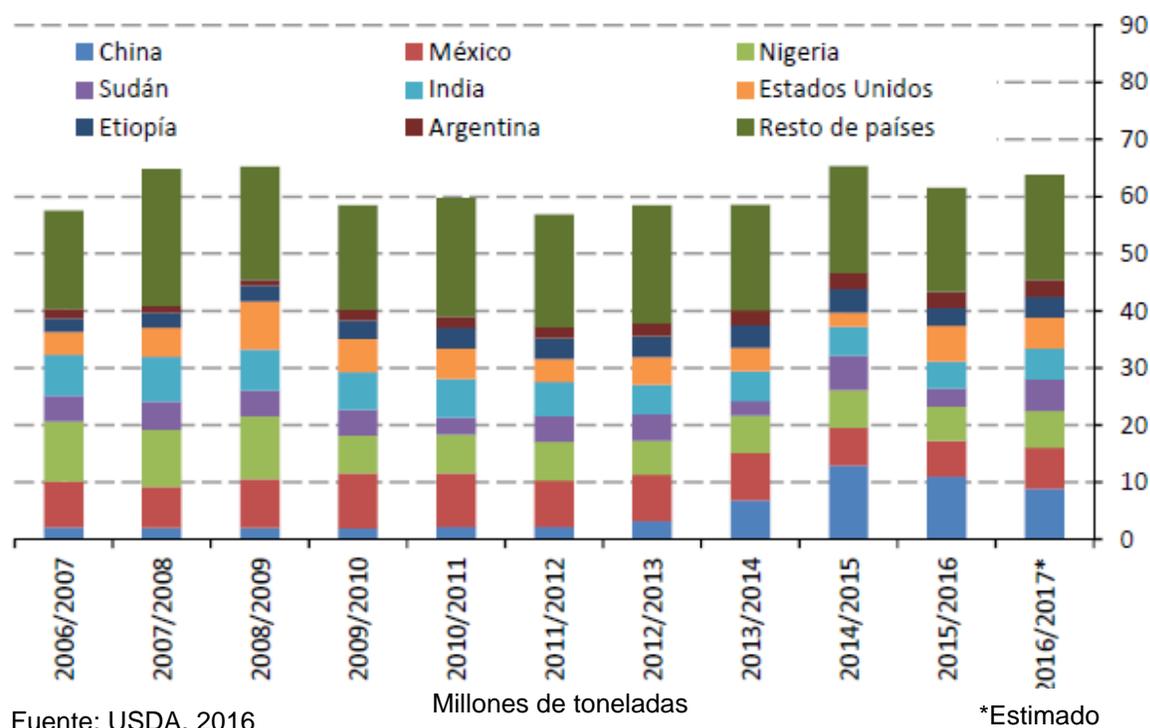


Figura 2. Principales países consumidores de sorgo, 2006/07 - 2016/17*

Composición Química y Anatómica del Grano de Sorgo

La composición anatómica del grano de sorgo está constituida de tres partes distintivas: (a) germen (9%) en la cual se concentran los componentes químicos que darán origen a la nueva planta; (b) endospermo, (75%) constituido principalmente por almidón y proteína y (c) pericarpio-testa (10-15%), comúnmente denominado salvado (Tabla 1; Figura 3). A su vez, esta última capa se encuentra dividida en tres partes

histológicas que son: pericarpio, mesocarpio y endocarpio. La aleurona es la capa que se encuentra entre el endocarpio y el endospermo.

De acuerdo con Hwang y col., (2002), se ha establecido que en el pericarpio y la capa aleurona están concentrados la mayor parte de la fibra dietaria y compuestos bioactivos o también llamados fitoquímicos.

Tabla 1. Composición química proximal del grano de sorgo entero y sus fracciones.

Fracción del grano	Peso	Proteína	Ceniza %	Grasa	Almidón
Grano entero	100	12.3	1.67	3.6	73.8
Endospermo	82.3	12.3	0.37	0.6	82.5
Germen	9.8	18.9	10.4	28.1	13.4
Salvado	7.9	6.7	2.0	4.9	34.6

Fuente: Hubbard y col., 1950.

Compuestos Bioactivos del Sorgo

En su origen, los polifenoles son metabolitos secundarios derivados de las vías del ácido shikímico o del acetato que aparecen como respuesta a situaciones de estrés (plagas, herbívoros, luz ultravioleta), haciendo a la planta más resistente (Bravo, 1998).

Los compuestos fenólicos son ubicuos en alimentos y bebidas de origen vegetal (verduras, cereales, legumbres, frutas, frutos secos, semillas, vino, sidra, cerveza, café, té, etc.), por lo que constituyen una parte importante de la dieta (Manach y col., 2005). Sin embargo, su concentración varía mucho no sólo entre especies vegetales, sino incluso entre cultivos de una misma especie, dependiendo tanto de características genéticas como de factores ambientales (Bravo, 1998).

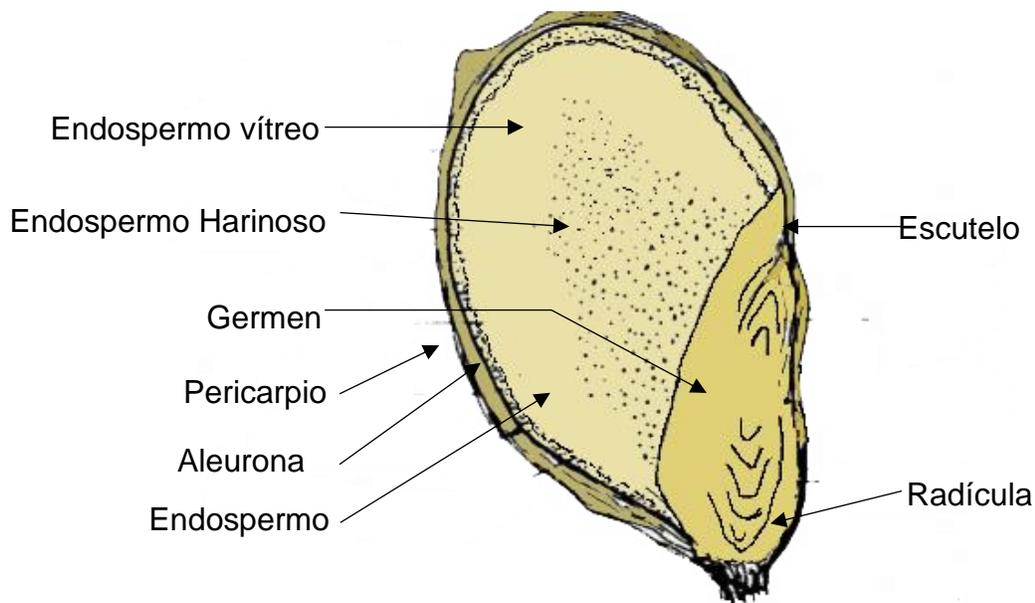


Figura 3. Principales partes anatómicas del grano de sorgo

Fuente: Sautier y O'Deye, 1989.

Estos compuestos que suelen acumularse en las partes externas de la planta (piel y cáscara, por ejemplo), son en gran parte responsables de las características organolépticas de los alimentos que los contienen (D'Archivio y col., 2010). Así mismo, los polifenoles están directamente relacionados con la coloración de frutas y verduras (Harborne, 1993).

Los compuestos fenólicos son los principales compuestos bioactivos del sorgo y están presentes en todas las variedades de este cereal (Dykes y Rooney, 2006; Awika y Rooney, 2004; Dykes y col., 2009). El perfil y el contenido de compuestos fenólicos en el sorgo es más diverso y más alto que los observados en trigo, cebada, arroz, maíz, centeno y avena (Tabla 2) (Ragae y col., 2006).

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se clasifican como derivados del ácido hidroxibenzoico y derivados del ácido hidroxicinámico. Estos ácidos exhiben una alta actividad antioxidante *in vitro* y por lo tanto puede promover beneficios para la salud humana (Kamath y col., 2004).

Tabla 2. Principales fitoquímicos presentes en los cereales de mayor consumo.

Cereal	Fenoles	Ácido	Acido	Ácido	Ácido
	Totales	Ferúlico	p-Coumárico	Sinápico	Vanílico
	mgEAG/Kg				
Trigo	350-1505	4.5-1270	0.2-37.2	1.3	0.6-35
Centeno	-	6-860	41	2-120	3-22
Avena	1223	359	-	55	17
Cebada	-	168-723	4-374	-	29.2-33.4
Maíz	2194-3010	380-1759	31	57	4.6
Sorgo Blanco	878.48	1400-2170	0-970	50-140	-

Modificado de: Chiremba y col., 2012; N'Dri y col., 2013
EAG: Equivalentes de ácido gálico

El contenido de ácidos fenólicos en algunas variedades de sorgo puede variar entre 135.5 y 479.40 $\mu\text{g} / \text{g}$ (Afify, y col., 2012b; Chiremba y col., 2012), con grandes cantidades de ácidos protocateico (150.3 a 178.2 $\mu\text{g} / \text{g}$) y ferúlico (120.5 a 173.5 $\mu\text{g} / \text{g}$) y pequeñas cantidades de ácidos p-coumárico (41.9 a 71.9 $\mu\text{g} / \text{g}$), siríngico (15.7 a 17.5 $\mu\text{g} / \text{g}$), vinílico (15.4 a 23.4 $\mu\text{g} / \text{g}$), gálico (14.8 a 21.5 $\mu\text{g} / \text{g}$), caféico (13.6 a 20.8 $\mu\text{g} / \text{g}$), cinámico (9.8 a 15.0 $\mu\text{g} / \text{g}$) y p-hidroxibenzoico (6.1 a 16.4 $\mu\text{g} / \text{g}$) (Afify y col., 2012a; Svensson y col., 2010). Los ácidos fenólicos presentes en frutas y verduras se encuentran predominantemente en sus formas libres y conjugadas, lo que permite que

sean fácilmente absorbidos en el tracto gastrointestinal (Hole y col., 2012). Por otro lado, los ácidos fenólicos en los cereales, inclusive en el sorgo, están mayoritariamente unidos a cadenas de arabinosilanos o lignina (Abdel-Aal y col., 2013; Dykes y Rooney, 2006; Hole y col., 2012). Estos ácidos fenólicos unidos no son hidrolizados por enzimas digestivas humanas, lo que disminuye su biodisponibilidad, pero existe la posibilidad de que ejerzan un potencial saludable a nivel colon (Hole y col., 2012; Saura-Calixto, 2010).

La acumulación de evidencia química, bioquímica, clínica y epidemiológica respalda los efectos quimio protectores de los antioxidantes fenólicos contra los trastornos mediados por estrés oxidativo (Soobrattee y col., 2005). El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos derivan principalmente de sus propiedades de captación de radicales libres y quelantes de metales, así como de sus efectos en las vías de señalización celular y en la expresión génica. Dentro de los ácidos fenólicos, debido a la presencia del grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ en los ácidos hidroxicinámicos, aseguran mayor eficiencia que el grupo COOH de los hidroxibenzoicos (Soobrattee y col., 2005), lo cual es apoyado por hallazgos de Castelluccio y col., (1995), quienes evaluaron su efectividad en la inhibición de la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL).

En particular, el ácido ferúlico ha demostrado su efecto benéfico sobre el estrés oxidativo en modelos murinos con diabetes inducida, en ellos se ha observado una disminución significativa en los niveles de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés), hidroxiperoxidos y ácidos grasos libres en el hígado. Además, un aumento de enzimas antioxidantes como el glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa (Balasubashini y col., 2004).

El ácido ferúlico se une en la posición O-5 de algunos residuos de arabinofuranosa de los arabinosilanos, a través de un enlace éster (Mathew y Abraham, 2004; Santiago y Malvar, 2010; Saulnier y Thibault, 1999; Zhang y col., 2014), pero también se puede vincular covalentemente a la lignina (Pedersen y col., 2015, Santiago y Malvar, 2010) y proteínas, mejorando la rigidez de las paredes celulares de las plantas (Pedersen y

col., 2015). Estas situaciones estructurales del ácido ferúlico e interacciones con otros componentes del grano, motivan a realizar estudios de mejoramiento de la accesibilidad de estos compuestos mediante el uso de tecnologías tradicionales o emergentes.

Tecnologías Aplicadas en el Sorgo para Mejorar el Contenido de Ácidos Fenólicos

La biodisponibilidad de compuestos fenólicos como el ácido ferúlico en los granos de cereales está determinada por su bioaccesibilidad (Anson y col., 2009a). La estructura de la matriz de fibra y la forma en que los compuestos fenólicos bioactivos insertados en la matriz de los cereales afectan fuertemente su función fisiológica. Por lo tanto, se han desarrollado diversas tecnologías de procesamiento para facilitar la liberación y/o aumentar la accesibilidad de los compuestos fenólicos unidos en granos de cereales. Lo anterior principalmente mediante la reducción del tamaño de partícula, la descomposición de las matrices de cereales o la degradación de los polímeros de fibra (Wang y Chen, 2014).

En este sentido, Salazar López y col., (2016) realizaron un estudio de extrusión en salvado de sorgo, encontrando que bajo condiciones de temperatura (180°C) y humedad (20%), se logró incrementar el contenido de fenoles totales hasta un 52%, mientras que la actividad antioxidante se incrementó un 54%. En otro estudio realizado por Zaroug y col., (2014), se observó un incremento del 69% de la actividad antioxidante en sorgo fermentado y horneado. Se han aplicado al sorgo tratamientos térmicos y los resultados en algunos casos han sido negativos, es decir los compuestos fenólicos se redujeron significativamente. Un estudio realizado por Hithamani y col., (2014a) reportó que el proceso de germinación de sorgo incrementó hasta un 5% los compuestos fenólicos a 25°C durante 48 h (Tabla 3).

La germinación pudiera ser un proceso factible de aplicar en grano de sorgo, toda vez que se trata de un proceso biológico que se lleva a cabo en la matriz intacta y que

mediante la adecuada selección de los factores que afectan la germinación pudiera ser posible la obtención de un producto germinado con funcionalidad biológica.

Tabla 3. Procesos tecnológicos aplicados al sorgo.

Proceso	CFT (%)	AA (%)	Referencia
Extrusión	52	53.1	Salazar y col., 2016
Fermentación	9.1	90.9	Zaroug y col., 2014
Microondas	6.9	11.0	Cardoso y col., 2014
Cocción	45.2	51.7	N'Dri y col., 2013
Germinación	5.4	N. D	Hithamani y Srinivasan, 2014a

CFT: Contenido de fenoles totales.

AA: Actividad antioxidante.

Germinación

Ha sido ampliamente estudiado que la germinación incorpora eventos que comienzan con la captación de agua por la semilla inactiva y terminan con el alargamiento del eje del embrionario, que se extiende para penetrar las estructuras que lo rodean (testa, endospermo, pericarpio) (Bewley, 1997). La movilización posterior de las principales reservas de almacenamiento, está asociada con el crecimiento de las plántulas (Bewley, 1997). Por lo tanto, los eventos físicos y bioquímicos subyacen a este proceso, es decir, el debilitamiento de las cubiertas de las semillas, la activación de la actividad metabólica, la activación de la transcripción de genes, la relajación de las paredes celulares embrionarias y el reensamblaje y la biogénesis de los orgánulos (Logan y col., 2001). Sin embargo, según la AACCC, (2008) los granos malteados o germinados que contienen todo el salvado, germen y endospermo originales, deben ser considerados granos integrales siempre y cuando el crecimiento del brote no exceda la longitud del grano y los nutrientes no hayan disminuido.

La formación de granos y semillas en la planta tienen como objetivo asegurar la supervivencia y propagación de la misma, por lo que estas tienen programada su acción de acuerdo con las condiciones que consideren óptimas para su desarrollo (variado entre especies). La formación de la semilla implica la interacción de diversos procesos relacionados. En la Figura 4 se muestra un esquema general del proceso de germinación y es importante destacar que las partes anatómicas de la semilla juegan un papel importante para que el proceso de germinación se pueda llevar a cabo (Nonogaki y col., 2010).

El proceso concluye cuando la radícula penetra y atraviesa las estructuras que rodean el embrión. Básicamente el proceso se divide en tres fases las cuales se describen a continuación.

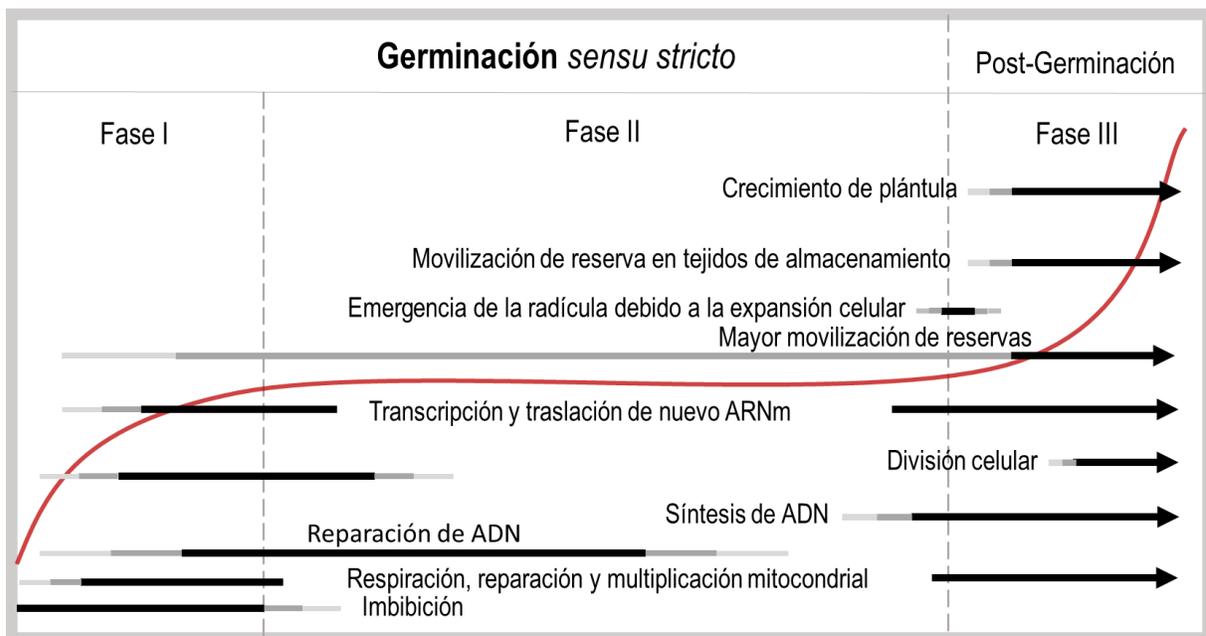


Figura 4. Curso temporal de eventos físicos y metabólicos que ocurren durante la germinación (Fases I y II) y crecimiento temprano de la plántula (Fase III).

Adaptado de Nonogaki y col., 2010; Nonogaki y Bradford, 2018; Bewley, 1997.

Línea roja: Proceso de absorción de agua de semillas.

Los tonos de las flechas indican la intensidad con la que se está llevando a cabo el proceso en cuestión.

Fase I: Imbibición

Con el ingreso de agua a la semilla se producen en forma temporal, alteraciones estructurales importantes, en particular en las membranas. Esa transición puede ser retrasada o inhibida por la presencia de azúcares (sacarosa, oligosacáridos de la serie rafinosa y estaquiosa), o proteínas como por ejemplo, las de embriogénesis tardía (LEA, por sus siglas en inglés). El hecho demuestra que, durante el proceso embriogénico de la semilla, los azúcares y proteínas LEA implicados en la preservación de las membranas durante la pérdida masiva de agua, se sintetizan antes de que se inicie la desecación (Matilla, 2008).

No obstante, con la rehidratación las membranas retornan rápidamente a un estado cristalino hidratado, condición más estable, por lo que prácticamente cesa la pérdida de solutos. La rehidratación permite que las enzimas y estructuras presentes en la semilla deshidratada, necesarias para el reinicio del metabolismo se activen (Matilla, 2008).

En general, se requieren varias horas antes de que el metabolismo alcance su pleno rendimiento. Durante este periodo se observa la degradación o reemplazo de componentes dañados. En forma simultánea se observa la síntesis de ADN, para reparar aquel que hubiese sido dañado durante la fase de maduración y deshidratación (Bewley, 1997).

Aun así, la curva de absorción de agua (Figura 4) coincide con la del proceso respiratorio. Esto se debe a que en esta primera fase predomina el proceso glicolítico, que ocurre en el citoplasma, aunque la mitocondria no es funcional, muchas enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas terminales están activas, lo que permite suministrar suficiente ATP para mantener el metabolismo en la fase inicial. En general, en aquellas semillas que almacenan almidón, la actividad metabólica se reinicia a partir de las mitocondrias preexistentes que fueron reparadas, mientras que las semillas que almacenan lípidos, la actividad respiratoria requiere de la síntesis de nuevas mitocondrias (Matilla, 2008).

La duración de cada fase dependerá de las características de la semilla (tamaño, contenido de sustratos hidratables, permeabilidad de la cubierta seminal, toma de O₂, etc.) y de las condiciones externas en las que se produce la imbibición (temperatura, composición del sustrato del suelo, contenido de humedad) (Matilla, 2008).

Esta fase tan rápida de absorción de agua provoca alteraciones temporales en la permeabilidad diferencial de las membranas de la semilla y, por consiguiente, una pérdida al medio circundante de solutos y diferentes metabolitos de bajo peso molecular (azúcares, ácidos orgánicos, iones, aminoácidos, péptidos, etc.). Finalmente, la hidratación de la semilla provoca la hidrólisis de algunas formas conjugadas de fitohormonas transformándose hacia formas libres (Matilla, 2008).

Fase II: Activación Metabólica o Germinación (*Sensu stricto*).

A diferencia de la fase anterior, esta fase se caracteriza por un cese en la absorción de agua y una actividad respiratoria más reducida. En esta fase predomina el ciclo de las pentosas fosfato y se ha visto que las sustancias inhibidoras de la respiración (KCN, NaN₃ y Na₂S) facilitan la germinación de muchas semillas, probablemente estimulando el ciclo. Esta activación puede ser debida a también el hecho de que, durante la fase de imbibición, las estructuras externas que rodean a la semilla, así como la densa estructura interna que rodea al embrión, restringen la difusión de oxígeno gaseoso, lo que produce una deficiencia de este elemento. Esto resulta en una mayor producción de piruvato de la que puede ser utilizada por el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones, reorientando el metabolismo hacia el ciclo de las pentosas fosfato (Bewley, 1997).

Durante esta fase ocurre la síntesis, a partir de las reservas disponibles de nuevas estructuras y compuestos necesarios para las fases siguientes del desarrollo. En ese sentido, y contrario de la fase III, la germinación *sensu stricto* es principalmente anabólica y por lo tanto endérgica, consumiendo la energía disponible (Matilla, 2008).

Previo a la aparición de la radícula, se producen cambios transcripcionales en la elongación y división celular. En general, los genes que codifican para el proceso de elongación tienden a ser activados en forma temprana, en la relación con la división celular, Dentro de los genes implicados en la elongación celular, pueden estar algunos activados por las giberelinas (Ogawa y col., 2003; Barnes y Anderson, 2018; Van Campenhout y col., 2007). Estos genes pueden expresarse para la síntesis de algunas proteínas importantes en el proceso de germinación, como por ejemplo:

- Acuaporinas, proteínas de las membranas implicadas en la absorción de agua.
- Endotransglucosidasas, xilanasas y glucanasas que mediante la hidrólisis de los componentes de la pared celular relajan estructuras rígidas.
- Expansinas, que rompen los puentes hidrógeno de las paredes celulares.
- Pectina metilesterasa (PME), que modifica la estructura de la pectina de las paredes celulares.

Fase III: Crecimiento de la Radícula.

Con la penetración de las envolturas de la semilla por parte de la radícula, se marca el final del proceso de germinación y el inicio del crecimiento de la plántula. Para que emerja la radícula, esta debe atravesar varias barreras internas, principalmente la testa y el endospermo. En la mayoría de las especies, la emergencia de la radícula requiere del debilitamiento de las estructuras que rodean la punta de la raíz (Matilla, 2008).

Mecanismos de Síntesis y Degradación de Compuestos Fenólicos Durante la Germinación

Las paredes de las células vegetales sirven como interfaces sensoriales entre las plantas y su entorno, estas contienen redes elaboradas de polisacáridos que regulan el crecimiento, el desarrollo, la mecánica, la comunicación, la adhesión de células a

células y la defensa (Barnes y Anderson, 2018; Somerville y col., 2004). Se pueden diferenciar dos eventos representativos durante el proceso de germinación que modifican el contenido de fenoles en el grano.

Reciclaje de las Paredes Celulares Ricas en Ácidos Fenólicos

La composición química de las paredes celulares de aleurona y endospermo se ha definido en detalle. Los arabinoxilanos y (1,3-1,4) β -glucanos representan en conjunto el 95% de los polisacáridos de la pared con aproximadamente el 2% de celulosa y glucomananos (Voiniciuc y col., 2018). Su organización molecular se ha comparado con un gel multicomponente reforzado con celulosa, que proporciona la resistencia necesaria para mantener la integridad del tejido y permitir la difusión libre de agua, fitohormonas y metabolitos de bajo peso molecular (Fincher y Stone, 1986).

Se ha indicado que las paredes celulares de las plantas representan el sumidero de energía y carbono más prominente en la naturaleza. Aunque las paredes de las células a veces se consideran recalcitrantes, exoesqueletos estáticos que simplemente proporcionan soporte estructural, incorporan cantidades significativas de azúcares ricos en energía y son un recurso de carbono potencialmente rico para plantas que experimentan un crecimiento rápido y transiciones de desarrollo. Esto plantea la cuestión de hasta qué punto las plantas reciclan la energía almacenada en sus paredes celulares, para optimizar el flujo metabólico durante el crecimiento y el desarrollo (Barnes y Anderson, 2018).

Aunque las paredes celulares no contienen material de desecho *per se*, es probable que algunos materiales sean más susceptibles a los factores biológicos y mecánicos que otros, según las interacciones de los polisacáridos, los requisitos de crecimiento y la etapa de desarrollo de la célula vegetal. Las plantas pueden escindir y volver a unir los polisacáridos de la pared celular para influir en la estructura de la pared y la mecánica. Las enzimas que escinden un polisacárido donador y ligan uno de los productos de degradación en una molécula aceptora diferente se denominan transglicosilasas (Barnes y Anderson, 2018; Figura 5).

La síntesis de polisacáridos abre la posibilidad de que los azúcares o fragmentos de pared de las células vecinas o las uniones compartidas, como las laminillas medias pueden contribuir a las primeras etapas de la formación de la pared secundaria, alimentando la biosíntesis de xilano y celulosa. Dada la presencia de transxilanasas en las plantas, pequeñas cantidades de xilanos de la pared primaria también podrían donarse a las células vecinas que sufren engrosamiento secundario, dependiendo de qué tan lejos puedan migrar los fragmentos de xilano. La degradación de xiloglucanos y la pectina también pueden contribuir con la glucosa, la xilosa, la arabinosa y el ácido glucurónico en la biosíntesis secundaria de celulosa y xilano de la pared celular (Minic, 2008).

Como se mencionó anteriormente, las paredes celulares secundarias están compuestas de celulosa, xilanos y lignina, un polímero polifenólico que se entrecruza con polisacáridos y residuos hidroxicinámicos encontrados en los xilanos (d'Errico y col., 2015; Du y col., 2014; Vogel, 2008). Lo anterior plantea la hipótesis de la posible liberación de estos ácidos fenólicos durante el proceso de reestructuración celular en la germinación, sin embargo, se deben considerar las interacciones que estas tengan con las especies reactivas del oxígeno (EROs).

Durante el reciclado de estructuras de las paredes celulares, es necesaria la actividad de enzimas degradativas de las cadenas de xilosas. Barnes y Anderson (2018) describen de manera muy interesante el reciclaje, reconstrucción y construcción de nuevas estructuras intra y extracelularmente (Figura 5).

Las enzimas capaces de degradar los arabinoxilanos y a sus constituyentes en la germinación de cereales, incluyen arabinofuranosidasas, endoxilanasas, exoxilanasas, y xilobiasas (o β -xilopiranosidasa) (Preece y MacDougall, 1958; Taiz y Honigman, 1976). Los análisis progresivos de productos de xilosas indican la acción inicial de las arabinofuranosidasas para eliminar el arabinosilo, las cadenas laterales abren el camino para la liberación de xilobiosa por una exoxilanasas y los productos de las endoxilanasas no se detectan hasta mucho más tarde en la germinación (Preece y MacDougall, 1958). Tres endoxilanasas de peso molecular 41, 000 KDa han sido

identificadas en grano de cebada cinco días después del inicio de la germinación (Slade, Hoj y Fincher, 1989). Como reportan Preece y MacDougall (1958), los niveles durante las etapas iniciales de germinación son muy bajos.

Las enzimas degradadoras de xilanos como las endo- β -1,4-xilanasas de la familia 10 de glicosil hidrolasas (GH10), cuya estructura general se describe como un barril β/α de 8 veces (Henrissat, 1991), hidrolizan el sustrato con la retención de su configuración anomérica mediante un mecanismo de doble desplazamiento en el que un ácido glutámico actúa como ácido catalítico/base y otro como nucleófilo catalítico (Simpson y col., 2003). Se ha demostrado que las plantas usan estas enzimas para la degradación de los componentes de la matriz de la pared celular en procesos tales como la movilización de nutrientes del endospermo en granos de cereales germinados (Benjavongkulchai y Spencer, 1986; Slade, Hoj y Fincher, 1989; Caspers y col., 2001), la lisis de la antera que contiene la pared en la maduración del polen (Bih y col., 1999), la hidrólisis de la superficie del estigma para la penetración del tubo polínico en el maíz (Wu y col., 2002) y el metabolismo de la pared celular secundaria durante el desarrollo del haz vascular en *Arabidopsis thaliana* (Suzuki y col., 2002).

Síntesis de *nov*o de Ácidos Fenólicos

Desde el momento en que la semilla rompe la latencia, surgen respuestas protectoras a través de la síntesis de compuestos fenólicos (Taiz y Zeiger, 1998). Esto debido a que durante la imbibición se forman EROs, principalmente H_2O_2 , posteriormente este se acumula como resultado de un pronunciado aumento en la producción intracelular y extracelular durante las primeras etapas de germinación. Además, la alta actividad de la respiración durante la germinación da como resultado la producción del anión superóxido durante fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, seguida de la dismutación a H_2O_2 (El Maarouf y Bailly, 2008).

Por otra parte, la semilla, se prepara ante diferentes tipos de estrés (Formadores de EROs), por ejemplo, herbívoros, patógenos, temperatura, pH desfavorable, estrés salino, metales pesados y radiación UV-B y UV-A.

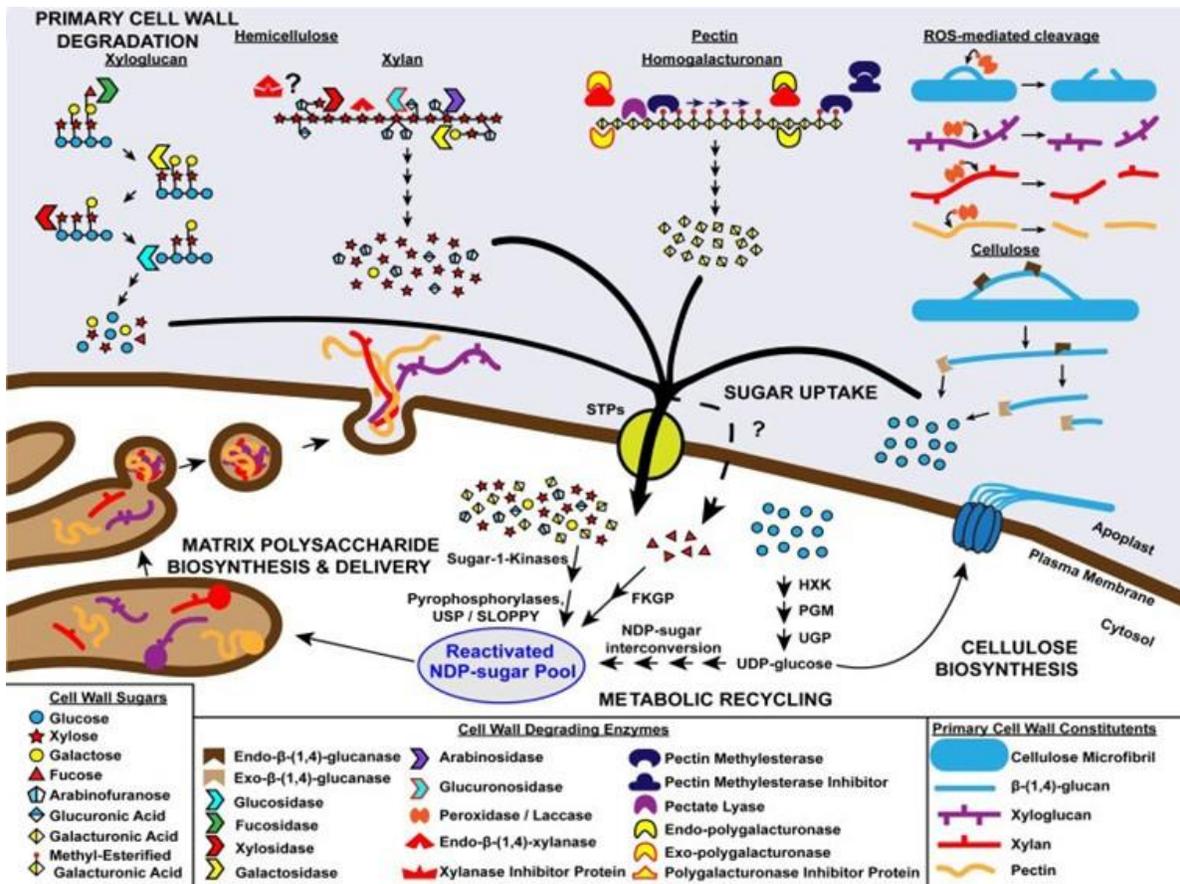


Figura 5. Vías metabólicas de reciclaje para los principales polisacáridos primarios de la pared celular.

Fuente: Barnes y Anderson, 2018

Ante el alto estrés oxidativo al que las plantas están sometidas, estas generan compuestos antioxidantes a través de la vía del ácido shikímico. Las enzimas responsables de la regulación del metabolismo fenólico son conocidas, y el ácido shikímico es un metabolito central (Santos-Sánchez y col., 2019).

La vía del shikimato consta de siete pasos de reacción, que comienzan con una condensación de tipo aldol de ácido fosfenolpirúvico (PEP) de la vía glicolítica y D-eritrosa-4-fosfato del ciclo de pentosa fosfato, para producir ácido 7-desoxi-D-arabinoheptulosónico 7-fosfato (DAHP). Un compuesto clave del punto de ramificación es el ácido corísmico, el producto final de la vía del shikimato (Santos-Sánchez y col., 2019).

En primer lugar, se produce una desaminación de la fenilalanina y / o la tirosina, lo que produce ácidos cinámicos y / o p- coumáricos, respectivamente. Posteriormente los anillos aromáticos de ácido cinámico y p- coumárico son hidroxilados y metilados para formar sus derivados, por ejemplo, ácidos ferúlico y cafeico. La desaminación, la hidroxilación y la metilación son las tres reacciones principales involucradas en la formación de ácidos fenólicos (Gross, 1985; Figura 6).

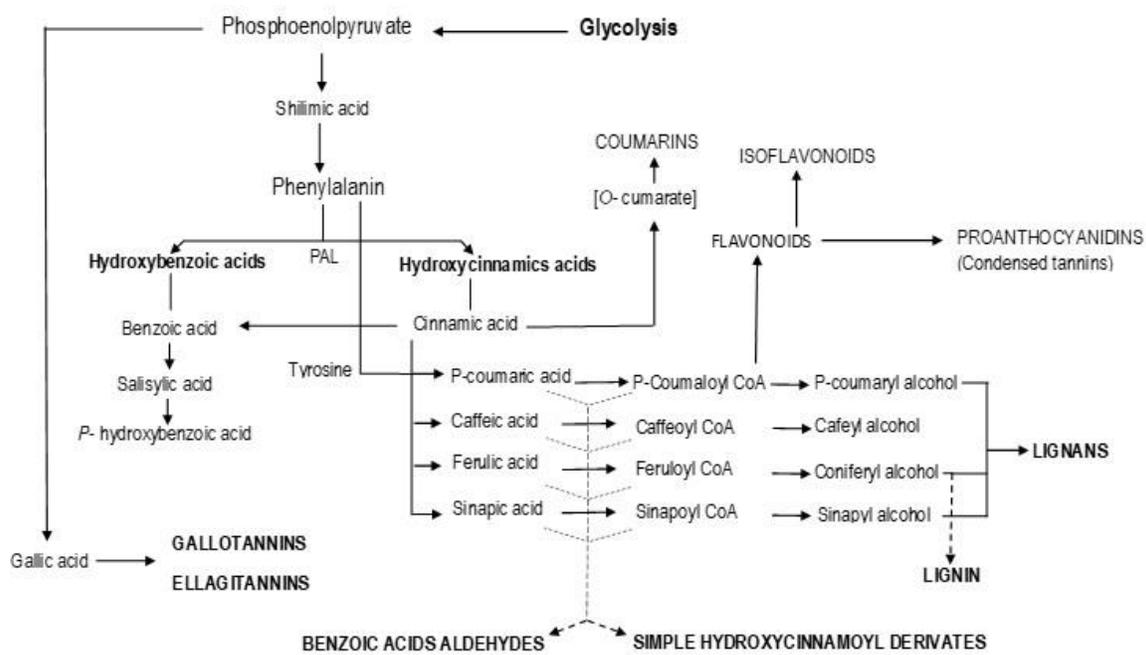


Figura 6. Ruta de la síntesis de *novo* de ácidos fenólicos

Adaptado de Parr y Bolwell, 2000; Ryan y col., 2002

Variables Involucradas en el Proceso de Germinación en Granos

Las pruebas o ensayos de germinación de semillas permiten determinar en primera instancia el potencial de germinación máximo de un lote de semillas (Moreno, 1984) y así estimar su valor potencial para la siembra. Este sería el objetivo primordial desde el punto de vista agronómico, no obstante, en los ensayos para establecer un proceso de germinación, los resultados van a diferir en función de si se realizan en un

laboratorio o en campo, en los que las variables a controlar en ambos casos pueden coincidir. Cualquier cambio o modificación en las condiciones pueden conducir a cambios en el proceso de germinación, y por tanto también se pueden alterar los procesos metabólicos inherentes a este proceso (Moreno, 1984). Las condiciones de germinación de granos a nivel laboratorio que pueden ser controladas, pueden variar desde control de humedad, temperatura, tiempo, tipo de sustrato y sanitización. A continuación, se explican algunas de las características de estas condiciones.

Sanitización

De acuerdo con la literatura, las soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes concentraciones, es el reactivo más comúnmente utilizado para la sanitización de las semillas. Las concentraciones pueden variar desde el 0.1% a 0.5% de solución de NaCl (Paucar-Menacho y col., 2017a; Ramakrishna y col., 2017). Al usar soluciones de NaClO , la sanitización generalmente se realiza a temperatura ambiente durante 5 a 30 minutos de remojo, con una proporción peso volumen de 1:5 (Paucar-Menacho y col 2017a). También el etanol al 70% ha sido utilizado para esterilizar semillas, con un tiempo de no más de 3 minutos de remojo (Pajak y col, 2014).

El proceso de sanitización tiene como fin el de eliminar microorganismos patógenos que puedan dañar al grano, e inclusive al consumidor. Un estudio realizado por Dornez y col., (2006) en el que evaluaron las enzimas xilanasas microbianas asociadas al grano de trigo y enzimas endógenas por separado, basándose en una separación física de las dos poblaciones mediante el lavado con hipoclorito de sodio de los granos de trigo antes de la cuantificación de la enzima. Se encontró que más del 90% de la actividad total de xilanasas asociada al grano de trigo puede originarse por contaminación microbiana. Teniendo el antecedente de que la actividad de las xilanasas tiene gran influencia en la degradación de las paredes celulares, resulta importante considerar el paso de esterilización de las semillas previo al proceso de germinación, cuando el

estudio sea enfocado hacia la obtención de productos germinados para consumo humano (Souza y col., 2007).

Estrés salino

La germinación de semillas es particularmente vulnerable a las condiciones de estrés ambiental, específicamente a la sal y el agua, que son un problema generalizado en todo el mundo (Carter y Chesson, 1996). El alto contenido de sal y las semillas con tolerancia a la sequía pueden mostrar una germinación rápida que da como resultado una buena plántula, por lo tanto, se espera que mantenga una productividad de alto rendimiento (Munns, 2002; Singh y Singh, 2012; Ashraf y Wahid, 2000).

El estrés salino conduce a una serie de cambios metabólicos, incluidos cambios en las actividades enzimáticas, un desequilibrio en los niveles reguladores del crecimiento de las plantas, así como una reducción en la hidrólisis y utilización de las reservas (Ahmad, 1992; Khan y Rizvi, 1994).

Se ha indicado que los cambios en el nivel de metabolitos secundarios en plantas, incluyendo compuestos fenólicos y terpenoides, mejoran los mecanismos de defensa contra el estrés, particularmente el oxidativo inducido por la alta concentración de salinidad (Wahid y Ghazanfar, 2006).

Se sabe que la sal conduce a la deshidratación celular y causa estrés osmótico y eliminación de agua del citoplasma, resultando en una reducción de los volúmenes citosólico y vacuolar. El estrés salino a menudo crea estrés tanto iónico como osmótico en las células, lo que resulta en acumulación o disminución de metabolitos secundarios específicos (Mahajan y Tuteja, 2005). Parida y Das, (2005) mostraron que las antocianinas aumentan en respuesta al estrés por sal, en contraste con esto, el estrés salino disminuyó los niveles de antocianina en las especies sensibles a la sal (Akula y Ravishankar, 2011).

Remojo

El remojo podría considerarse como un acelerador de la brotación, esto debido a que, si se omite este paso, la brotadura aún así se dará si las condiciones de humedad relativa son adecuadas. En estudios llevados a cabo en trigo se demostró que el tiempo de remojo previo a la germinación puede variar desde 24-48 horas, específicamente concluyeron que a 24 horas de remojo el grano de trigo presentó un alto porcentaje de germinación (Yang y col., 2001).

Tras el proceso natural de obtención de agua de las semillas (imbibición), hay una fuga de solutos indicativos de daño temporal de la membrana (Nonogaki y col., 2010). Dentro de esa fuga pueden estar presentes los ácidos fenólicos libres, como se demostró con el proceso de remojo en trigo, maíz y sorgo (Tablas 4 y 5; Ramadan y col., 2012), donde, el contenido de estos compuestos disminuyó.

Tabla 4. Efecto del proceso de remojo y germinación sobre el contenido fenólico.

Matriz	Control	Tiempo de Remojo		Tiempo de Germinación (horas)		
		12	12	24	36	48
Trigo	381.4±6.9	323.5±10.6	338±11.2	290.4±3.6	265±5.51	224.7±9.7
Maíz	288.5±7.0	271.3±4.2	290.6±0.9	245.5±9.5	190.3±5.5	161.7±6.5
Sorgo	204±11.3	173.6±2.5	159.4±2.7	149.6±6.9	143.5±5.4	130.7±8.7

Modificado de Ramadan y col., 2012.
Expresados en mgEAG/100g

Fotoperiodo

En presencia de luz los cloroplastos y los peroxisomas de las plantas son la principal fuente de generación de EROs, mientras que, en la oscuridad las mitocondrias parecen ser los principales. Se ha estimado que el 1-5% del consumo de O₂ de mitocondrias aisladas da como resultado la producción de EROs (Mollerm, 2001).

Tabla 5. Efecto del proceso de remojo y germinación sobre la capacidad secuestrante del radical DPPH (%).

Matriz	Control	Tiempo de Germinación (horas)				
		Tiempo de Remojo 12	12	24	36	48
Trigo	34.4±0.8	32.08±3.3	31.89±3.5	30.74±3.8	30.63±1.8	27.0±1.3
Maíz	33.0±1.94	28.59±1.4	30.11±3.8	28.16±4.4	29.16±2.4	26.4±1.8
Sorgo	37.2±0.89	31.00±3.5	31.09±1.1	28.41±1.6	27.56±1.3	25.8 ±1.5

Modificado de Ramadan y col., 2012.

Los fitocromos son la principal clase de fotorreceptores responsables de la recepción de la luz. Las señales de luz recibidas por los fitocromos se convierten en señales internas, que a su vez regulan los procesos fisiológicos en las semillas. La giberelina (GA) y el ácido abscísico (ABA) son las señales internas que desempeñan un papel central en la regulación de la germinación de las semillas; GA induce, mientras que ABA inhibe la germinación de la semilla. Estudios recientes han comenzado a revelar una estrecha interacción entre las vías de señalización de luz, GA y ABA en semillas a nivel molecular (Seo y col., 2009).

El fitocromo B (PhyB), el principal fitocromo acumulado en las semillas, media la respuesta fotorreversible típica para promover la germinación en la fase temprana de la imbibición. Después de una imbibición prolongada en la oscuridad, el fitocromo A (PhyA) se acumula en las semillas y promueve la germinación en respuesta a fluencia muy baja de amplio rango de longitud de onda de UV-A rojo lejano (FR), respuesta irreversible de fluencia muy baja (VLFR) o irradiación relativamente larga de luz (FR-HIR). Los fitocromos son proteínas dímeras que consisten típicamente en dos apoproteínas idénticas (Seo y col., 2009).

Temperatura

Estudios *in vitro* sugieren que el estrés térmico causado por la exposición de las semillas a altas temperaturas, producen especies reactivas al oxígeno, tales como: radicales superóxidos, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno en el centro de reacción del fotosistema 2 (PS II), que son eliminados por antioxidantes, incluyendo superóxido dismutasa (SOD) (Bukhov y Mohanty,1999). Las plantas tolerantes generalmente se protegen de los efectos dañinos de las especies reactivas al oxígeno con la síntesis de diversos componentes antioxidantes, los que controlan la expresión génica e influyen en procesos esenciales como el crecimiento, respuestas de estrés abiótico y defensa de patógenos (Abiko y col., 2005). Estos componentes se han encontrado en casi todos los compartimentos celulares, lo que indica la importancia de la desintoxicación de EROs para la supervivencia celular (Iba, 2002; Mittler y col., 2004; Asada, 2006). Dado al estrés por calor, la planta podrá proveer al grano de las defensas necesarias para su futuro desarrollo.

Existe información limitada del efecto de la temperatura sobre xilanasas endógenas durante la germinación. Sin embargo, en estudios de xilanasas de origen fúngico o bacteriano, en la mayoría de los casos se reportan óptimamente activas a temperaturas mesofílicas (40-60°C) y pH ligeramente ácido. Así mismo, se ha encontrado que también son activas en pH (2-11) y temperatura extremas (5-105°C) (Collins y col., 2005). En un estudio de germinación de centeno se reportó que las bajas temperaturas en relación con el aumento de actividad de endo xilanasas, influenciaron la actividad enzimática (Kołodziejczyk y Michniewicz, 2004; Hübner y col., 2010).

Germinación Asociada a Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante

Las semillas germinan en una amplia gama de condiciones ambientales, sin embargo, el principal determinante de la germinación es la disponibilidad de agua (Bewley y Black, 1994). En condiciones desfavorables, la germinación se retrasa o se suprime por completo en función de la intensidad del estrés y el fondo genético (Foolad, 1999).

Se pueden identificar 2 tipos de estrés, el biótico y el abiótico. El estrés biótico es el causado por la acción de los seres vivos, como los pequeños o grandes animales, otras plantas, y los denominados agentes patógenos (bacterias, hongos, virus y viroides). El estrés abiótico, dependiendo de la naturaleza del agente causal, puede dividirse en físico y químico. Entre los físicos, se encuentran el déficit hídrico, la salinidad (en su componente osmótico), las temperaturas extremas (calor, frío, congelación), la excesiva o insuficiente irradiación, la anaerobiosis producida por encharcamiento o inundación, el estrés mecánico producido por el viento o la excesiva compactación del suelo, y el inducido por heridas o lesiones. El estrés químico está causado por la salinidad (en su componente iónico o tóxico), por la carencia de elementos minerales y por los contaminantes ambientales como el dióxido de azufre (SO₂), los óxidos de nitrógeno (NO_x), los compuestos clorofluorocarbonados (CFC), el ozono (O₃) y los metales (Serrano y Cadenas, 2008).

Las condiciones adversas inducen cambios transitorios en los niveles de determinados iones (Ca²⁺) y moléculas (lípidos, especies reactivas del oxígeno, antioxidantes, óxido nítrico), que advierten a la célula de que ha sido detectada una señal de estrés. Las hormonas realizan una importante función en las rutas de transmisión intracelular de la señal de estrés (Serrano y Cadenas, 2008).

Para poder activar las defensas de forma rápida, las plantas han tenido que desarrollar un sistema complejo de vigilancia, además de una serie de barreras estructurales o químicas. El reconocimiento de un patógeno incompatible (aquellos que fracasaron en su intento de infección) dispara una serie de respuestas que se conocen en su conjunto como respuesta hipersensible (HR) (Serrano y Cadenas, 2008).

En la denominada hipótesis gen a gen, el reconocimiento del patógeno por la planta se debe a la interacción, directa o indirecta, del producto de un gen de resistencia de la planta (gen R) con el producto del correspondiente gen de avirulencia del patógeno (gen Avr). Este reconocimiento conlleva la activación de diferentes rutas metabólicas (enzimas que fortalecen la pared celular, síntesis de especies reactivas de oxígeno síntesis de fitoalexinas y de proteínas defensivas) y el suicidio selectivo de algunas células en las que se acumulan todos estos compuestos de actividad anti patogénica

impidiendo, de esta manera, el posible ataque posterior de especies necrotróficas (Serrano y Cadenas, 2008).

En resumidas cuentas, los estreses abióticos afectan fuertemente a la bioenergética de las células vegetales. Las mitocondrias de las plantas pueden controlar la generación de EROs mediante sistemas de disipación de energía. Por lo tanto, las mitocondrias pueden desempeñar un papel central en la adaptación de las células al estrés abiótico, que inducen estrés oxidativo a nivel celular. Se ha encontrado que los sistemas de disipación de energía de las mitocondrias del trigo duro, disminuyen la producción de EROs mitocondrial. La activación inducida por EROs del canal de potasio mitocondrial de la planta sensible al ATP (PmitoKATP) y la proteína desacopladora de la planta (PDP) se ha encontrado que, en la mitocondria del control y las plántulas hiperosmóticas estresadas, a su vez disipan el potencial de membrana mitocondrial y reducen las posibilidades de producción de ROS a gran escala (Pastore y col., 2007).

Sistemas Antioxidantes en las Plantas

La maquinaria de defensa antioxidante protege a las plantas contra daños por estrés oxidativo causados por las EROs, entre ellos se pueden incluir agentes enzimáticos muy eficientes (superóxido dismutasa [SOD], catalasa [CAT], ascorbato peroxidasa [APX], glutatión reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa [DHAR], glutatión peroxidasa [GPX] peroxidasa de guaicol [GOPX] y glutatión S- transferasa [GST]). Entre los no enzimáticos se encuentra (ácido ascórbico [ASH], glutatión [GSH], compuestos fenólicos, alcaloides, aminoácidos no proteicos y α -tocoferoles). Los sistemas de defensa antioxidante trabajan en conjunto para controlar las cascadas de oxidación incontrolada y proteger plantar células del daño oxidativo por barrido de las EROs (Gill y Tuteja, 2010).

Por otra parte, se sugiere que la respuesta ante las situaciones de estrés en las plantas, generarán metabolitos secundarios como coadyuvantes a los antioxidantes enzimáticos, además, este tipo de metabolitos incrementarán proporcionalmente en

las semillas como futura defensa ante los tipos de estrés que surjan durante su crecimiento. Entre los tipos de estrés, se encuentra la radiación UV que provocará la síntesis de antocianinas, psoralenos, esteroides de ácidos fenólicos unidos a ácidos orgánicos, ácido salicílico; el ozono que puede inducir a la síntesis de ácido salicílico, esteroides de ácidos fenólicos unidos a la pared celular y lignina; heridas de la planta que pueden estar asociadas a síntesis de cumarinas, psoralenos, ácido clorogénico, esteroides de ácidos fenólicos unidos a la pared celular, lignina y suberina; deficiencia de hierro, que puede promover la síntesis de ácidos fenólicos; carencia de fosfatos asociados a síntesis de antocianinas; la falta de nitrógeno, que influencia la síntesis de flavonoides; las bajas temperaturas que incentivan la síntesis de antocianinas, y por último la presencia de patógenos que se ha asociado con la síntesis de flavonoides, pterocarpanos, estilbenos, cumarinas, auronas, ácido salicílico (Azcón y Talón, 2000).

En semillas, por ejemplo, los azúcares y polifenoles desempeñan un papel en la estabilización de proteínas y membranas (Crowe y col., 1992; Bartels y Salamini 2001; Kranner y col., 2002; Kranner y Birtic, 2005, Moore y col., 2005). La acumulación de metabolitos se ha demostrado que juega un papel protector durante el secado de las semillas maduras (Leprince, 1993; Fait y col., 2006; Angelovici y col., 2010).

La trehalosa y la umbelífera pueden promover transiciones vítreas que protegen a las células de las lesiones asociadas con la deshidratación (Crowe y col., 1984; Wolkers y col., 2001; Whittaker y col., 2004). Los flavonoides pueden proporcionar una barrera química al disminuir la permeabilidad a la humedad (Debeaujon y Koornneef, 2000; Rajjou y Debeaujon, 2008), limitando el daño durante el almacenamiento (Sagasser y col., 2002). Los tocoferoles antioxidantes lipofílicos pueden limitar la oxidación lipídica no enzimática durante la desecación de la semilla en el almacenamiento y las etapas de germinación temprana (Sattler y col., 2004; Horvath y col., 2006).

La evidencia sugiere que estas acciones cubren la variación natural de los rasgos del desarrollo de semillas y la respuesta al estrés (Alonso-Blanco y col., 1999; Hannah y col., 2006; Laserna y col., 2008; Jha y col., 2010).

Germinación en Cereales para el Mejoramiento del Contenido de Compuestos Fenólicos

La germinación ha sido estudiada en espelta, cebada, avena, sorgo, centeno y arroz integral. Estos estudios particularmente han sido dirigidos hacia la evaluación del efecto del proceso de germinación sobre el mejoramiento en la composición nutricional y cambios en las concentraciones de algunos componentes bioactivos (Donkor y col., 2012).

Partiendo de la premisa de que los granos germinados contienen cantidades sustanciales de fenoles totales, un estudio en centeno germinado demostró que este grano poseía cantidades significativamente más altas de fenoles totales en comparación con los granos no germinados (Donkor y col., 2012). La actividad antioxidante de los extractos fenólicos estuvo entre el 13% y el 73% para los granos no germinados y el 14% y el 53% para los germinados. En este mismo estudio se evaluó también el efecto de la germinación de cebada y sorgo, como fuentes potenciales de compuestos fisiológicamente bioactivos efectivos para la reducción del riesgo de los agentes diabéticos y el cáncer de colon (Donkor y col., 2012).

Es escasa la información en la literatura que aborde los efectos de la germinación sobre los compuestos bioactivos en sorgo. Posiblemente el estudio más representativo es el publicado por Dicko y col., (2005), quienes seleccionaron 50 variedades de sorgo, germinando a 27 °C por 72 horas. Ellos encontraron que, en promedio, la germinación no afectó el contenido en compuestos fenólicos totales, pero disminuyó el contenido de proantocianidinas, 3-desoxiantocianinas y flavan-4-ols. Independientemente de la germinación, existe diferencia en la actividad antioxidante entre las diferentes variedades de sorgo estudiadas. En este estudio se observó que los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante correlacionaron positivamente en aquellas variedades de sorgo no germinadas.

Por otra parte, Paucar y col., (2017a) optimizaron el tiempo y la temperatura de germinación para maximizar el contenido de ácido γ -aminobutírico (GABA), compuestos fenólicos totales (CFT) y actividad antioxidante en brotes de maíz morado.

La composición fenólica de maíz morado obtenidos en las condiciones óptimas se analizó mediante HPLC-DAD-ESI / MS. Se encontró que las condiciones ideales de temperatura (26 °C) y tiempo (63 h) mejoraron 3.5 veces el contenido de GABA en comparación con las semillas sin germinar. Estas condiciones, sin embargo, redujeron ~ 30 y ~ 15% CFT y actividad antioxidante, respectivamente, en maíz morado. Los modelos desarrollados mostraron altos coeficientes de determinación, demostrando su adecuación para explicar las variaciones en los datos experimentales. En los brotes obtenidos con las condiciones óptimas se encontró a las antocianinas como la clase fenólica más abundante, detectada principalmente como glucósidos de cianidina, pelargonidina y peonidina o sus derivados de malonilo. Ácidos hidroxicinámicos derivados y flavonoles fueron detectados como compuestos menores. Por lo tanto, la germinación a 26 °C durante 63 h puede ser considerada como una estrategia innovadora para diversificar la utilización del maíz morado, proporcionando al mismo tiempo brotes con altos niveles de fitoquímicos. Los brotes de maíz morado pueden constituir prometedores promotores de la salud alimentos (Paucar y col., 2017a; Tabla 6).

Tabla 6. Principales características de la germinación en sorgo y otros cereales.

Producto	Remojo	Fotoperiodo	Condiciones de germinación			Conclusiones	Referencia
			Temperatura (°C)	Tiempo (Horas)	Humedad Relativa (%)		
Sorgo	nd	nd	30	16,48,96,144	90	La concentración de polifenoles fue variada en el transcurso de la germinación	Subramanian y col., 1992
Sorgo	Agua/obscuridad/ 20-25 °C por 16h	nd	27	72	90	En promedio, la germinación no afecto el contenido de fenoles	Dicko y col., 2005
sorgo	24h/16.5 °C	Obscuridad	16.5	120	98	Aumentan las concentraciones de los antioxidantes	Donkor y col., 2012
Trigo	24-48 h	Obscuridad	16.5	216	98	Aumento ferúlico y vanílico, significativo después de las 168 h, remojo a 24 h fue mejor.	Yang y col., 2001
Maíz	Relación semilla/ agua 1:5 (p/v) tep/ambiente por 24h	Obscuridad	12-28	216	90	Optimización: 26 °C/ 63h aumentaron las GABA	Paucar y col., 2017a
Amaranto	Semilla/ Agua (p/v) / 24h/temperatura ambiente	Obscuridad	12-28	12-72	90	Aumenta la actividad antioxidante Óptimo: 26 °C/ 63 h	Paucar y col., 2017b
Mijo	nd	Luz	Ambiente	48	Intervalos	Aumento contenido fenólico	Hithamani y Srinivasan 2014a

nd: no determinado

Bioaccesibilidad de Compuestos Bioactivos de Granos Germinados

La bioaccesibilidad se define como la fracción de un compuesto que se libera de su matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, queda disponible para la absorción intestinal (Cilla y col., 2018). Sin embargo, el procesamiento de los alimentos es uno de los principales determinantes de la bioaccesibilidad, ya que puede tener un impacto positivo o negativo al aumentar o disminuir los niveles de nutrientes y compuestos bioactivos, respectivamente (Sánchez, 2009). Por ejemplo, los procesos de extrusión (180 °C y 20% humedad) y asado (150 °C y 1h) aumentaron el contenido de compuestos antioxidantes bioaccesibles (Salazar-López y col., 2016; Wu y col., 2013a). Por otro lado, el calentamiento por microondas, y la cocción con olla abierta, disminuyeron el contenido de polifenoles bioaccesibles (Hithamani y Srinivasan 2014b).

No existe información en torno al proceso de germinación y bioaccesibilidad en sorgo, sin embargo, se menciona que la germinación de cereales podría aumentar los compuestos fenólicos extraíbles, usualmente en solventes de alta polaridad como el metanol (Bondia-Pons y col., 2009, Kaukovirta-Norja y col., 2004, Liukkonen y col., 2003). Además de aumentar el contenido fenólico total, se ha informado una mejora significativa en el contenido de vitamina E para varios granos de cereales germinados (Kim y col., 2012, Žilić y col., 2013), principalmente debido a la generación de una variedad de componentes bioactivos, incluidos los tocoferoles y tocotrienoles (Moongngarm y Saetung, 2010).

Alimentos Funcionales

El término alimento funcional se introdujo por primera vez en Japón a mediados de la década de 1980 (Hasler, 1998). El Consejo de Nutrición y Alimentación de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos los define como, alimentos modificados o que contengan un ingrediente que demuestre una acción que incremente el bienestar del individuo o disminuya los riesgos de enfermedades, más

allá de la función tradicional de los nutrientes que contiene (Thomson y col., 1999). Por otra parte, ILSI (International Life Sciences Institute) los define como, alimentos que, por virtud de la presencia de componentes fisiológicamente activos, proveen beneficios para la salud, más allá de la acción clásica de los nutrientes (Clydesdale, 1999).

Por ello, según Roberfroid, (2000), un producto alimentario puede ser funcional eliminando un componente que se sabe que causa un efecto perjudicial cuando se consume, aumentando la concentración de una sustancia naturalmente presente en los alimentos, agregando un ingrediente que normalmente no está presente, reemplazando algún elemento, cuya ingesta suele ser excesiva y aumentando la biodisponibilidad de un compuesto que se sabe, produce un efecto funcional.

Por otra parte, el diseño y desarrollo de alimentos funcionales comienzan con un conocimiento científico básico relevante para las funciones que son sensibles a la modulación por los compuestos de los alimentos, que cuando se modifican, pueden estar relacionados con la presencia de una enfermedad. Así mismo, la explotación de este conocimiento en el desarrollo de marcadores relevantes para las funciones clave. Además, estudios de intervención humana basados en la hipótesis de que incluirán el uso de estos marcadores validados y relevantes que permitirán el establecimiento de ingestas seguras y efectivas. Por último, el desarrollo de técnicas avanzadas para estudios en humanos que, preferiblemente son mínimamente invasivas y aplicables en gran escala (Roberfroid, 2000).

En particular, los cereales se cultivan en más del 73% del área total cosechada en el mundo y contribuyen con más del 60% (Charalampopoulos y col., 2002). En los últimos años, los cereales y sus ingredientes son aceptados como alimentos funcionales y nutracéuticos por proporcionar fibra dietética, minerales, energía, proteínas, vitaminas y antioxidantes necesarios para la salud humana (Ötles y Cagindi, 2006).

Los compuestos biológicamente activos se encuentran principalmente en el salvado de los cereales, (Kulawinek y col., 2007). Los productos basados en harina de cereales refinados como galletas, pasta, pan, etc., están privados de estas fracciones, por lo que, generalmente se suplementan con estos compuestos (Edge

y col., 2005; Jones y col., 2002). Sin embargo, se descubrió que estos suplementos muestran actividades de promoción de la salud mucho más débiles en comparación con los componentes de granos naturales (Slavin y col., 2001).

Los productos horneados como el pan, galletas y pasteles son categorías populares para la innovación debido a su consumo generalizado. Estos nuevos desarrollos a menudo han impactado las propiedades organolépticas de los productos terminados y, por lo tanto, la aceptación del consumidor (Birch y Bonwick, 2019).

Es por ello que los procesos tecnológicos y la adición de compuestos bioactivos de otras fuentes alimentarias, han demostrado mejorar el potencial biológico de los productos alimenticios, como por ejemplo en panes con polvo de granada (FT +46 y 181%) (Martins y col., 2017), galletas de amaranto germinado (DPPH +21.43 g/100 g) (Chauhan y col., 2015), en galletas de mijo malteado (FT+ 15%) (Adebiyi y col., 2017), panes integrales de trigo bioprocesado (FTL +31%) (Amaya Villalva y col., 2018) y galletas con cascara de mango (FT +447%) (Bandyopadhyay y col., 2014) etc.

Mientras tanto, dentro de los cereales disponibles en el mercado como alimentos funcionales, son aquellos los que contienen fibra dietética, como β -glucano, arabinoxilano, oligosacáridos, como galacto y fructo-oligosacáridos y almidón resistente (Ötles y Cagindi, 2006). Su objetivo principal de uso es como sustratos fermentables para el crecimiento de microorganismos probióticos, fuentes de carbohidratos no digestibles, estimulador del crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias presentes en el colon (Brennan y Cleary, 2005; Charalampopoulos y col., 2002). Dentro de los cereales utilizados, se encuentran avena, cebada, centeno, y farro (*Triticum dicoccum*) (Alldrick, 2010; Poutanen, 2006; Bigliardi y Galati, 2013). El sorgo ha sido extensivamente estudiado desde un punto de vista de aporte nutricional, no obstante en las últimas décadas ha venido creciendo el interés por estudiar su potencia biológica, redireccionando las investigaciones hacia los efectos de consumo sobre biomarcadores de inflamación asociados a obesidad y cáncer en modelos murinos o en cultivos celulares.

HIPÓTESIS

La optimización del proceso de germinación en sorgo permitirá el incremento de ácido ferúlico asociado a la actividad de la enzima β -1,4 endoxilanasas, dando lugar a la posibilidad de obtener un alimento con potencial funcionalidad biológica.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener un alimento potencialmente funcional a base de harina de sorgo germinado y estudiar su relación con la actividad de la enzima β -1,4 endoxilanasas.

Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones óptimas de germinación de grano de sorgo, para obtener un mayor contenido de compuestos fenólicos y ácido ferúlico.
2. Evaluar el comportamiento de β -1,4 endoxilanasas durante el proceso de germinación de sorgo y su relación con el contenido de ácido ferúlico.
3. Evaluar la bioaccesibilidad del ácido ferúlico en la harina de sorgo germinado, mediante un modelo de simulación gastrointestinal *in vitro*.
4. Obtener un alimento potencialmente funcional a partir de harina germinada de sorgo, bajo las condiciones previamente establecidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y Preparación de la Muestra

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) fue proporcionado por la Fundación Produce Nayarit. Los granos se limpiaron manualmente para eliminación de impurezas y posteriormente fueron seleccionados los granos intactos, es decir, aquellos que no presentaron rasgaduras en la corteza o quebrados. Una vez seleccionado el material este fue almacenado a 4-8 °C.

Procedimiento de Germinación

Para el establecimiento de las condiciones óptimas de germinación del sorgo, se hizo uso del método de superficie de respuesta. Primeramente, se estableció el diseño experimental, mediante el cual se fijaron los tratamientos a evaluar. Las variables independientes se seleccionaron de acuerdo a un estudio preliminar. De tal manera que fueron considerados para el estudio las variables de tiempo (10, 19 y 28 horas) y temperatura (20, 27.5 y 35°C). De este diseño experimental surgieron 13 tratamientos de germinación de sorgo los cuales se muestran en la Tabla 7.

Para la germinación, las semillas de sorgo (25g) se enjuagaron con agua destilada y luego con hipoclorito de sodio al 0.1% en una proporción 1:3 (p/v) durante 5 minutos. Posteriormente se drenó el hipoclorito de sodio y se enjuagaron los granos con agua destilada. Las semillas se colocaron en placas Petri estériles que contenían algodón, papel filtro y sanitas húmedas como sustrato. Se colocaron en bandejas de germinación en una germinadora automática (modelo 1000FAT, SEEDBURO). La germinación se llevó a cabo con fotoperiodos de 8 h luz y 16 oscuridad, humedad relativa de 98% y temperaturas de 20, 27.5 y 35 °C, a tiempos de 10, 19 y 28 h.

El sorgo germinado bajo las condiciones establecidas fue sometido a un proceso de liofilización (Labconco modelo 13027183) para extraer la humedad, posteriormente los granos se molieron en un molino a <0.5 mm (Perten), obteniendo así, harina de sorgo germinada (HSG). Cada uno de los tratamientos se llevó a cabo por duplicado, las variables respuesta fueron: contenido de fenoles totales libres (FTL)

y ligados (FTLIG), así como de ácido ferúlico libre (AFL) y ligado (AFLIG) y la correspondiente actividad antioxidante medida por DPPH y TEAC. Estas variables fueron también evaluadas en harina de sorgo sin germinar (HS) como control.

Obtención de Extractos Metanólicos y Alcalinos

Para solubilizar los compuestos fenólicos libres presentes en las muestras de HS y HSG, se procedió a la obtención de extractos metanólicos de acuerdo con lo propuesto por Salazar-López y col., (2016). Brevemente, en tubos cónicos de 25 mL se pesó 1g de cada una de las muestras y a cada tubo se le añadieron 15 mL de metanol 80%, se cerraron y sometieron a sonicación durante 1h, posteriormente se centrifugó 1.000 x g durante 15 min. Este procedimiento se repitió 2 veces. Los tres sobrenadantes se mezclaron y se filtraron con papel filtro Whatman No. 1. Los sobrenadantes se evaporaron en un rotavapor al vacío hasta sequedad y se re-suspendieron en 7 mL de metanol al 50%. La concentración de los extractos metanólicos fue de 0.15 g/mL.

Para la liberación de compuestos fenólicos ligados a la matriz alimentaria, se procedió a realizar una extracción alcalina de acuerdo con lo sugerido por Guo y Beta, (2013). Se partió del residuo obtenido de la extracción metanólica, el cual fue sometido a secado en estufa a 45°C. Posteriormente se tomaron 100 mg del residuo seco y se mezclaron con 5 mL de NaOH (2N desgasificado), y se desplazó el aire con nitrógeno por 30 segundos y se sonicó por 3 horas. Se ajustó el pH a un rango de 1.5-2.0 con HCl 6N. Después se añadieron dos volúmenes de etil acetato (7 mL aprox). Por separación de fases, se obtuvieron los compuestos liberados por la solución alcalina, para lo cual los tubos se agitaron de manera manual y después se centrifugaron a 1,000 x g/15 min; este proceso se repitió tres veces. Los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados y concentrados hasta sequedad a 40 °C en un rotavapor y resuspendidos en 7mL de metanol (50%). La concentración final de los extractos alcalinos fue de 0.014g/ml.

Determinación de Fenoles Totales

Los compuestos fenólicos totales (libres y ligados) de cada uno de los tratamientos y control se cuantificaron siguiendo la metodología propuesta por Singleton y Rossi, (1965), con modificaciones para adaptar el ensayo a un lector de microplacas FluoStar Omega, (BMG Labtech Inc., Ortenberg, Alemania). Se mezclaron 30 μ L de cada uno de los extractos con 150 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido previamente 1:10 con agua deionizada) en un pocillo de microplaca, añadiendo 120 μ L de una solución de carbonato sódico (0.075 m/mL), la mezcla fué homogenizada y se dejó reaccionar en la oscuridad durante 60 min. Los cambios en la absorbancia fueron monitoreados a 765 nm contra un blanco reactivo. Para calcular la concentración de fenoles totales se elaboró una curva de calibración con ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (mgEAG)/g de muestra.

Cuantificación de Ácido Ferúlico por UHPLC-DAD

El ácido ferúlico se cuantificó usando un sistema UHPLC (Agilent Technologies 1260, USA) con un detector de arreglo de diodos (DAD). La separación se llevó a cabo en una columna de resolución rápida Zorbax Eclipse Plus (50 mm x 2.1 mm i.d.). Se utilizó un sistema binario de elusión correspondiendo a la Fase A: Agua: ácido acético (99.9:0.1); Fase B: metanol: ácido acético (99.9:0.1). El gradiente de elusión fue el siguiente: 0-9 min 91% fase A; 9-11 min 86% fase A; 11-15 min 84 % fase A. La velocidad de flujo fue de 0.7 mL/min y el ácido ferúlico fue detectado a 280 nm de acuerdo con el tiempo de retención, para lo cual se utilizó una curva de referencia de ácido ferúlico a diferentes concentraciones. Los resultados se expresaron en μ g ácido ferúlico/g (Salazar-López y col., 2016).

Actividad Antioxidante

Ensayo TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox por sus siglas en ingles). El ensayo se basa en la capacidad de las moléculas antioxidantes para captar el radical catiónico ABTS \bullet +. Brevemente, para la activación del radical

ABTS, fue necesario se pesar 0.019 mg del radical ABTS y disolverlo en 5 mL agua destilada, posteriormente a la mezcla se le adicionaron 88 μ L de persulfato de potasio (37.8mg/mL), se mezcló vigorosamente y se dejó en la obscuridad durante 16-18 horas a temperatura ambiente. Se preparó una solución de trabajo mezclando 1 mL de la solución madre con aproximadamente 88 mL de etanol. En un pocillo de microplaca se mezclaron 280 μ L de la solución de trabajo con 20 μ L de cada uno de los extractos de HSG y se dejó reaccionar durante 5 min. Los cambios en la absorbancia fueron monitoreados a 715 nm en un lector de microplaca y registrados como % de actividad secuestrante de radical ABTS. Los resultados se expresaron como μ mol equivalentes trolox (ET) por gramo de muestra, para lo cual se utilizó una curva de Trolox.

Ensayo DPPH. El ensayo DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil)] se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Robles y col., (2009) adaptado a microplaca. El ensayo se basa en la capacidad secuestrante del radical DPPH. En pocillos de microplaca fueron mezclados 280 μ L de una solución metanólica de DPPH (0.025 mg/mL) con 20 μ L de cada uno de los extractos de HSG y se dejaron reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente en la obscuridad. Después, los cambios en la absorbancia fueron monitoreados a 515 nm en un lector microplaca y registrados como actividad secuestrante de radical DPPH. Para expresar los resultados como μ mol ET/g de muestra, fue necesario preparar una curva estándar utilizando Trolox como estándar de referencia.

Extracción y Evaluación de la Actividad de la Enzima β 1,4 Endoxilanasas

Para la evaluación de la actividad de la enzima fue necesario llevar a cabo una extracción de la enzima de las muestras de sorgo germinado y sin germinar. Para este ensayo se seleccionaron 9 tratamientos de germinación derivados del proceso de optimización. El proceso de extracción se hizo de acuerdo con lo reportado por Mangan y col., (2018), la evaluación de la actividad de la enzima se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor del Kit XylX6 Method de megazyme.

Brevemente, a 0.5 g de cada una de las muestras de HS y HSG le fueron adicionados 8 mL de solución tampón de acetato de sodio 0.1 M (pH 5.5) conteniendo albumina de suero bovino (0,5 mg/mL). Las mezclas fueron agitadas en tubos Falcón ocasionalmente a temperatura ambiente por 15 min para facilitar la extracción de la enzima xilanas. La suspensión se centrifugó a 6000 x g por 15 min hasta obtener un sobrenadante transparente que se recuperó y se usó inmediatamente. Se obtuvieron alícuotas (0.5 mL) de cada una de las soluciones y posteriormente se equilibraron previamente a 30°C durante 5 minutos e incubaron con alícuotas (0.1 mL) pre-equilibradas de reactivo XylX6 a 30°C. Las reacciones se detuvieron inmediatamente después de la adición de 0.9 ml de una solución de Tris al 2% (pH 10.0) y se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm usando un espectrofotómetro Cary 50 Modelo UV1003M093.

Cálculo de la Actividad Enzimática

Para el cálculo de la actividad enzimática se consideró que una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de 4-nitrofenol del sustrato XylX6 en un minuto bajo las condiciones de ensayo definidas. Se utilizó la siguiente ecuación provista por MEGAZYME (XylX6 Method, 2018) y los resultados se expresaron como $\mu\text{m XylX6/min}$.

$$\text{Unidades/mL XylX6} = \frac{\Delta E_{400}}{\text{Tiempo de Incubación}} \times \frac{\text{Volumen Total en Celda}}{\text{Alicuota del Ensayo}} \times \frac{1}{\epsilon \text{ mM}} \times \frac{\text{Vol. de Extracción}}{\text{Volumen de Muestra}} \times \text{Dilución}$$

Donde:

ΔE_{400} = Absorbancia (Reacción) – Absorbancia (Blanco)

Tiempo de Incubación = 30 min

Volumen total en la celda = 1.5 mL

Alicuota del ensayo = 0.05 mL

ϵ_{mM} 4-Nitrofenol = 18.1 (at 400 nm) en 2% buffer Tris (pH 10)

Volumen de Extracción = 50 mL por 1 mL

Dilución = Dilución adicional del extracto original (si se requiere).

Simulación de la Digestión Gastrointestinal *in vitro*

En la Figura 7 se muestra el procedimiento general para el ensayo de simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Este se realizó siguiendo los protocolos propuestos por Salazar-López y col., (2018) y Amaya Villalva y col., (2018) con ligeras modificaciones. Las muestras sometidas a proceso de digestión fueron dos: sorgo germinado bajo las condiciones óptimas obtenidas mediante el modelo de superficie de respuesta y sorgo sin germinar. El ensayo consistió en tres fases de digestión (oral, gástrica e intestinal), para lo cual se consideraron parámetros fisiológicos relevantes. Enseguida se describen los procedimientos para cada fase de la digestión.

Fase oral

Tres voluntarios asintomáticos en ayunas masticaron 1 g de cada una de las muestras de sorgo germinado y no germinado 15 veces durante ~ 15 s, los sujetos expulsaron el sorgo masticado hacia 18 tubos falcón de 50 mL (9 por cada muestra). Posteriormente se enjuagaron la boca dos veces con 5 ml de agua durante 60 s y luego expulsaron el líquido hacia sus respectivos tubos Falcón. Se homogenizó la muestra y se dejó aproximadamente en reposo por 2-3 min. Enseguida fueron separados 6 tubos (tres por cada muestra) y estos fueron etiquetados como fase de digestión oral.

Fase gástrica

Doce tubos falcón fueron llevados a digestión gástrica, agregando 5 mL de solución tampón HCl-KCl (0,2 M) con el pH ajustado a 1.5. Luego, se agregaron 667µL de solución de pepsina (300 mg / mL) y se incubaron a 37°C durante 1 h en un baño de agua con agitación (Precision Scientific Mod. 66800 Winchester, VA, EE. UU.), a 100 rpm. Posterior a este tiempo fueron retirados 6 tubos Falcón y etiquetados como digestión gástrica.

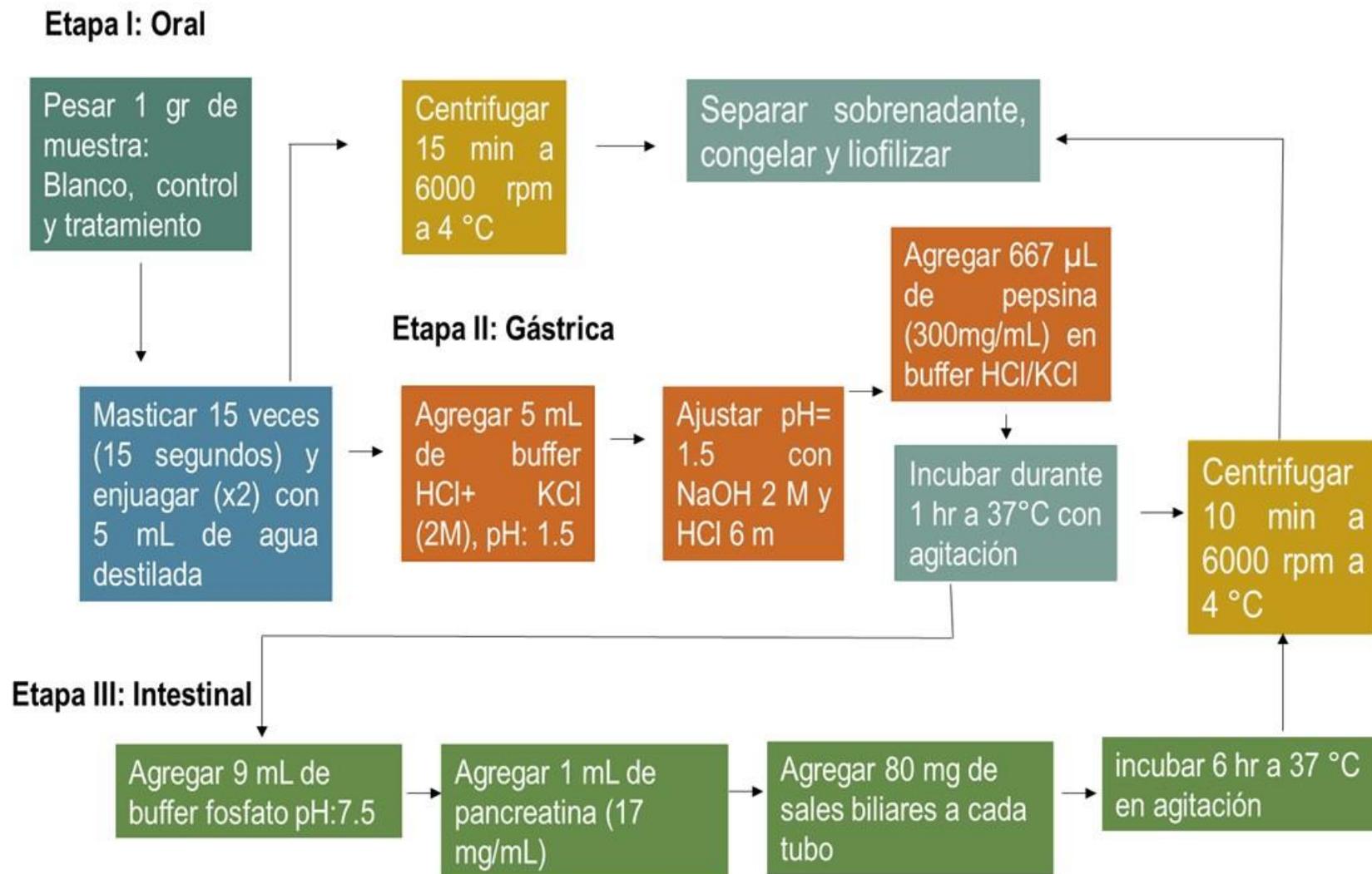


Figura 7. Diagrama general de la simulación gastrointestinal *in vitro*

Fase intestinal

Los seis tubos restantes fueron llevados a digestión intestinal agregando 9 mL tampón fosfato (0.1 M, pH 7,5) y ajustando el pH a 7.5. Posteriormente, se agregó 1 ml de solución de pancreatina (17 mg / mL) y sales biliares (80 mg), y la mezcla se incubó durante 6 h en un baño de agua con agitación a 37 ° C y 100 rpm para obtener finalmente el digesto intestinal.

Los productos de las tres fases de digestión (oral, gástrica e intestinal) y sus respectivos blancos fueron centrifugadas 6000 rpm/4 °C/10 min. Los sobrenadantes fueron recuperados y liofilizados. Las muestras liofilizadas se disolvieron en 5 mL de metanol al 50% y posteriormente filtradas (Econofiltr NylIn 0.25 mm 0.45 µm, Santa Clara, CA, Estados Unidos).

A cada uno de los digestos se les determinó contenido de fenoles totales libres, ácido ferúlico y actividad antioxidante por los métodos descritos anteriormente.

Diseño de un Alimento con Potencial Funcionalidad Biológica

Para este estudio se consideró la preparación de un alimento tipo cereal para desayuno, a partir de la harina de sorgo germinado obtenida mediante proceso de optimización. El alimento preparado comúnmente se le llama “atole” o “crema” y se sirve caliente. Para la preparación de la crema de harina de sorgo germinado se utilizó la harina que resultó con mayor contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante. Además de usar como alimento control la harina de sorgo sin germinar, también se consideró relevante incorporar alimentos similares que eventualmente se encuentran en el comercio local. Para fines prácticos se les denominó AC1 (crema de maíz); AC2 (crema de trigo) y AC3 (crema de trigo). La preparación de las cremas se realizó siguiendo las instrucciones de los productos comerciales. Se pesaron 17 g para las muestras comerciales y 35 g para las harinas de sorgo, y fueron colocadas en recipientes para cocción, luego, las harinas fueron homogenizadas en 50 mL de leche fría y posteriormente se le añadieron 200 mL de leche previamente calentada a 70°C, finalmente se procedió a la cocción hasta llegar a 80°C agitando constantemente hasta lograr una solución espesa (aproximadamente 7 min). Las muestras fueron retiradas del fuego, enfriadas a

temperatura ambiente y almacenadas a 4°C para los posteriores análisis. A cada uno de los productos finales se les determinó el contenido de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para el estudio de optimización de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante se hizo uso de un diseño central compuesto centrado en la cara (dos factores y tres niveles), con cinco puntos centrales (JMP 5.0.1). Las variables independientes de temperatura (20, 27.7 y 35 °C) y el tiempo de germinación (10, 19 y 28 h) se combinaron para investigar los efectos sobre las variables dependientes. En la Tabla 7 se muestran las corridas experimentales con sus correspondientes valores codificados y sin codificar (valores verdaderos).

Para el experimento se seleccionó un modelo de regresión polinomial de segundo orden. Esta ecuación predice los efectos lineales (β_1, β_2), cuadráticos (β_{11}, β_{22}), e interacción (β_{12}) de las variables independientes temperatura de germinación (β_{11}) y tiempo (β_{22}) con la variable dependiente (Y):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j + E$$

Donde Y es la variable respuesta predicha, β_0 la constante (intercepto), β_i es el coeficiente lineal, β_{ii} los coeficientes cuadráticos y β_{ij} es el coeficiente de producto cruzado. X_i y X_j son variables independientes. Cada una de las corridas experimentales se llevaron a cabo por duplicado.

El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para establecer la significancia del modelo, la bondad de ajuste de los modelos obtenidos se evaluó calculando los coeficientes de determinación múltiple (R^2). Se estableció la significancia de la falta de ajuste del modelo para cada una de las variables respuesta y fueron obtenidos los valores de los coeficientes de la ecuación. Para los análisis de regresión se utilizó el software MINITAB 17. Las gráficas de contorno y de superficie de respuesta se obtuvieron mediante el programa STATISTICA versión 13.5.0.17.

Se realizó una prueba de validación utilizando las condiciones óptimas obtenidas por los modelos de predicción, utilizando las variables de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante.

Para el estudio de la relación del contenido de ácido ferúlico en el sorgo germinado con la actividad de la enzima, el efecto del proceso de germinación de sorgo sobre la bioaccesibilidad de fenoles totales y ácido ferúlico y la evaluación del alimento funcional terminado se llevó a cabo un análisis de varianza y las pruebas de diferenciación de medias mediante la prueba de Tukey a una $p < 0.05$.

Tabla 7. Condiciones experimentales de germinación de sorgo a diferentes tiempos y temperaturas.

Corrida	Factores	
	Temperatura (°C) (X ₁)	Tiempo (h) (X ₂)
	Valores codificados (Valores verdaderos)	
1	-1 (20)	-1 (10)
2	-1 (20)	+1 (28)
3	+1 (35)	-1 (10)
4	+1 (35)	+1 (28)
5	-1 (20)	0 (19)
6	+1 (35)	0 (19)
7	0 (27.5)	-1 (10)
8	0 (27.5)	+1 (28)
9	0 (27.5)	0 (19)
10	0 (27.5)	0 (19)
11	0 (27.5)	0 (19)
12	0 (27.5)	0 (19)
13	0 (27.5)	0 (19)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo al estudio de optimización de las condiciones de germinación en sorgo, fue necesario llevar a cabo un estudio preliminar con el fin de establecer la conveniencia del uso de variables como la sanitización y el remojo en el grano. Los resultados derivados de este estudio mostraron que la sanitización del grano no mostró cambios significativos en relación al tiempo de germinación, por lo que se consideró importante tomar en cuenta esta variable para el experimento debido a que el producto derivado del proceso de germinación fue destinado a consumo humano. Por otra parte, el proceso de remojo que se aplicó al grano durante 24 horas demostró que a mayor tiempo de remojo menor tiempo de emergencia del eje embrionario (germinación en sentido estricto). En la Figura 8 es posible observar que el mayor tiempo de germinación (17.26 horas), correspondió a los granos de sorgo que no fueron sometidos a remojo, mientras que el menor tiempo (7.32 horas) correspondió al sorgo en remojo durante 24 horas. La explicación a este comportamiento puede ser atribuida a que la expansión celular en el embrión está impulsada en parte por fuerzas creadas por la imbibición de la semilla y la absorción de agua en las células embrionarias (Munz y col., 2017). Además, la alta presencia de agua durante el proceso de remojo de los granos de sorgo, está influenciada por la alta presión de turgencia que pudieron recibir las células del pericarpio, testa y endospermo. Lo anterior explica los bajos tiempos de elongación del eje embrionario durante el proceso de remojo (Penfield, 2017).

Otro aspecto importante a destacar es que el contenido de compuestos fenólicos se afectó por el remojo de los granos, ya que se presentó un incremento hasta del 123.13% en sorgo sin remojo, en comparación de un sorgo sin germinar (Figura 9). Estos resultados concuerdan con Ramadan y col., (2012; Tablas 4 y 5) en trigo, maíz y sorgo remojados por 12 horas y germinados hasta por 48 h, en el cual el remojo disminuyó el contenido de compuestos fenólicos. Estos hallazgos pueden ser el reflejo del flujo dinámico y complejo de la germinación (Paucar y col., 2017a, b).

Cabe mencionar que en el sorgo sometido a germinación y sin remojo, la actividad antioxidante tuvo un incremento significativo (63%) respecto al sorgo sin germinar,

mostrándose una asociación significativa ($R^2=0.68$, $P<0.0001$) con el contenido de fenoles totales (Figura 10).

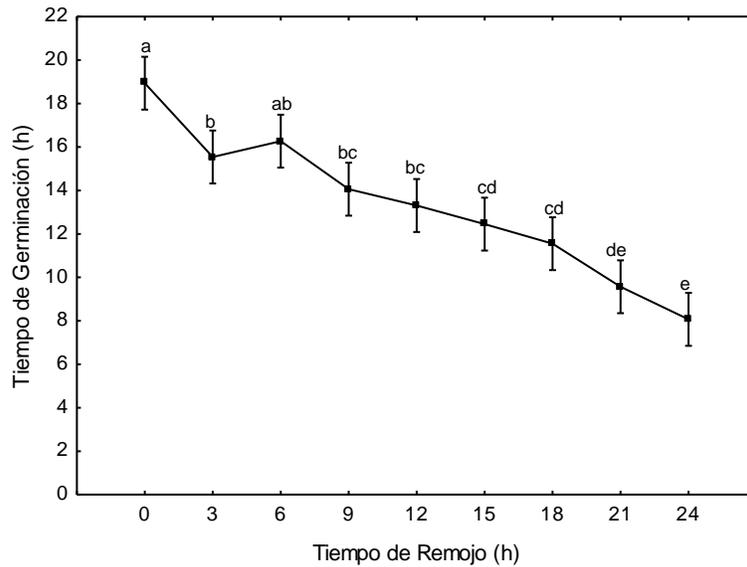


Figura 8. Efecto del tiempo de remojo sobre el tiempo de germinación de granos de sorgo.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P\leq 0.05$)

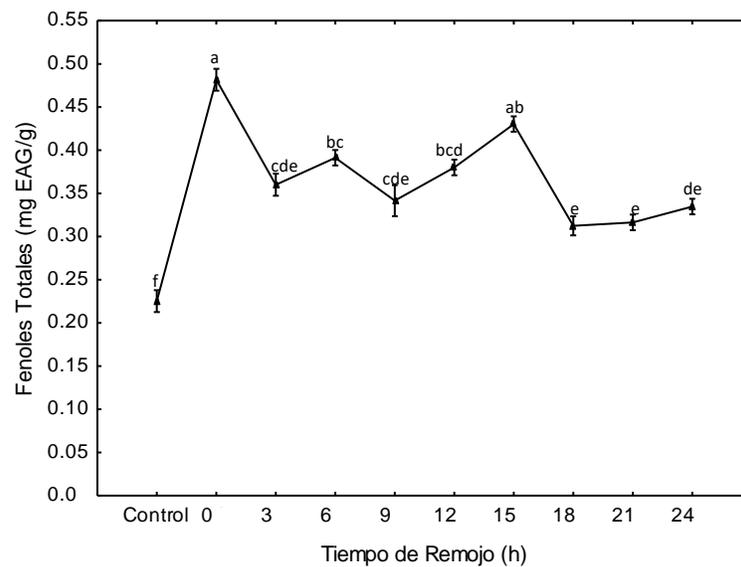


Figura 9. Contenido de fenoles totales libres en diferentes tiempos de remojo de sorgo.

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($P\leq 0.05$)

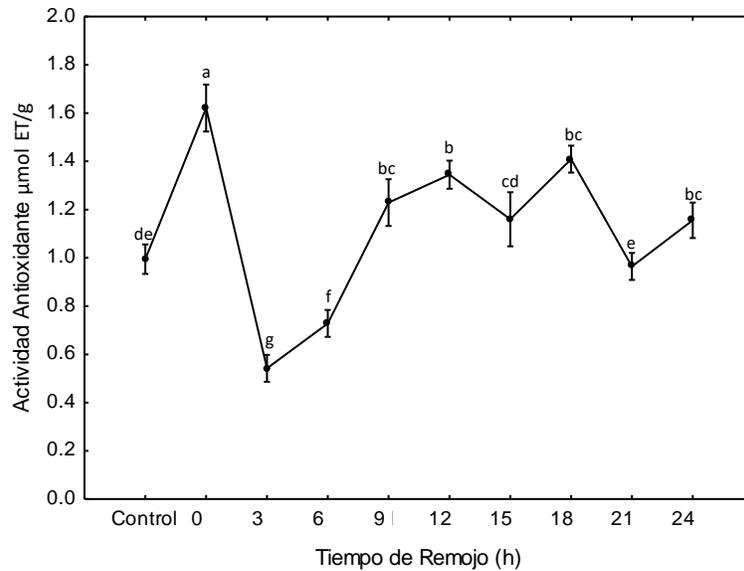


Figura 10. Efecto del tiempo de remojo en sorgo, sobre la actividad antioxidante medida por DPPH.

Diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre experimentos para la misma variable dependiente.

La aceleración del proceso de germinación en las semillas puede relacionarse con algunos aspectos hormonales, por ejemplo, el ácido abscísico, una de las hormonas antagonistas de la germinación puede disminuir su concentración cuando la semilla se encuentra en fase de imbibición. De aquí que la ausencia de remojo en las semillas posiblemente provocó que el ácido abscísico se incrementará por tanto impidiendo o retrasando la germinación (Chiwocha y col., 2005; Nakabayashi y col., 2005; Hermann y col., 2007; Linkies y col., 2009; Preston y col., 2009).

Del estudio preliminar se pueden destacar algunos aspectos importantes: 1) el proceso de remojo acelera la germinación; y 2) el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante se incrementan notablemente cuando no existe remojo previo en la semilla. No obstante, el estudio de optimización por la metodología de superficie de respuesta pudiera arrojar resultados más concluyentes.

Optimización de las Condiciones de Germinación de Sorgo y su Influencia sobre el Contenido de Fenoles Libres y Actividad Antioxidante

De acuerdo con el diseño central compuesto centrado en la cara propuesto para el estudio de optimización de las condiciones de germinación (tiempo y temperatura) del sorgo, para el aumento de fenoles libres y actividad antioxidante, en la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de cada una de las corridas experimentales.

Los resultados derivados del análisis de fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante para cada uno de los tratamientos de germinación propuestos, demostraron que para cualquiera de los tratamientos evaluados el contenido de fenoles libres y actividad antioxidante se incrementó significativamente en comparación con el sorgo sin germinar. Los valores de los tratamientos oscilaron desde 0.12 ± 0.007 hasta 0.31 ± 0.011 mgEAG/g vs 0.112 ± 0.004 mgEAG/g en fenoles totales libres y 34.17 ± 2.29 hasta 57.08 ± 1.28 vs 16.61 ± 0.41 µg AF/g para ácido ferúlico en sorgo germinado y sin germinar. Por otra parte, la actividad antioxidante mostró valores que fueron desde 0.85 ± 0.06 hasta 1.32 ± 0.03 µmET/g para DPPH y de 1.46 ± 0.05 a 2.13 ± 0.02 µmET/g para TEAC. El incremento para los valores máximos de capacidad antioxidante fue de 62 y 41% para DPPH y TEAC, respectivamente.

En cuanto a los resultados de los fenoles totales ligados, se observó un comportamiento fluctuante con respecto al tiempo y temperatura de germinación. Una tendencia similar se presentó también para la actividad antioxidante de las fracciones ligadas. Lo anterior nos permite sugerir que el incremento de compuestos fenólicos y ácido ferúlico no proviene exclusivamente de la liberación de estos compuestos es decir que pudiera ser posible que dadas las condiciones de la germinación los compuestos fenólicos pudieran haberse incrementado también a partir de síntesis *de novo* (Glennie, 1983; Jood y col., 1987; Taylor y Duodu, 2015).

Tabla 8. Efecto de los factores combinados de tiempo y temperatura de germinación de sorgo sobre fenoles totales, ácido ferúlico y actividad antioxidante de las fracciones libres y ligadas.

Tratamiento	Patrón	Temperatura	Tiempo	FTL	FTLIG	AFL	AFLIG	DPPHL	DPPH LIG	TEACL	TEAC LIG
		(°C)	(h)	(mg EAG/g)	(µg ferúlico/g)		(µm ET/g)				
Control		0	0	0.11±0.004	1.04±0.02	16.61±0.41	354.99±4.87	0.81±0.008	11.44±0.23	1.51±0.10	17.18±0.03
1	--	20	10	0.12±0.007 ^{defg}	1.37±0.05 ^a	41.25±0.72 ^{efg}	582.56±8.92 ^a	1.098±0.04 ^{bc}	10.74±0.79 ^a	1.76±0.06 ^{cd}	22.03±0.54 ^a
2	+-	20	28	0.14±0.006 ^{de}	1.20±0.04 ^{bc}	45.63±1.49 ^{cd}	379.32±14.14 ^c	0.85±0.06 ^d	9.86±0.25 ^b	1.90±0.084 ^{bc}	16.96±0.85 ^e
3	+-	35	10	0.11±0.008 ^{fg}	1.06±0.06 ^{de}	44.81±1.20 ^{def}	351.09±22.81 ^c	0.96±0.02 ^{cd}	9.20±0.31 ^b	1.49±0.03 ^f	17.41±0.71 ^{de}
4	++	35	28	0.31±0.011 ^a	1.16±0.01 ^{bc}	57.08±1.28 ^a	391.14±2.127 ^c	1.31±0.04 ^a	9.33±0.17 ^b	1.89±0.05 ^{bc}	17.34±0.58 ^{de}
5	a0	20	19	0.11±0.004 ^g	1.18±0.06 ^{bc}	40.61±1.09 ^{gh}	441.55±22.11 ^b	0.84±0.001 ^d	9.63±0.36 ^b	1.58±0.001 ^{ef}	19.06±0.80 ^b
6	A0	35	19	0.18±0.007 ^c	1.12±0.01 ^{cd}	46.23±0.92 ^{bc}	366.53±21.45 ^c	0.86±0.005 ^d	9.47±0.42 ^b	1.46±0.05 ^f	18.01±0.73 ^{cd}
7	0a	27.5	10	0.13±0.005 ^{def}	1.03±0.009 ^e	34.17±2.29 ^k	447.07±46.62 ^b	1.08±0.06 ^{bc}	9.63±0.52 ^b	1.77±0.07 ^{cd}	17.04±0.58 ^e
8	0A	27.5	28	0.22±0.01 ^b	1.07±0.01 ^{de}	45.91±1.07 ^{cde}	474.47±41.89 ^b	1.32±0.03 ^a	9.71±0.20 ^b	2.13±0.02 ^a	18.52±0.35 ^{bc}
9	0	27.5	19	0.13±0.01 ^{de}	1.20±0.05 ^b	36.42±1.90 ^{hijk}	375.05±38.62 ^c	0.92±0.004 ^d	9.04±0.69 ^b	1.54±0.05 ^f	18.39±0.14 ^{bcd}
10	0	27.5	19	0.14±0.007 ^d	1.20±0.05 ^b	36.91±2.64 ^{hijk}	351.81±25.32 ^c	0.93±0.03 ^d	9.07±0.46 ^b	1.59±0.05 ^{ef}	18.13±1.15 ^{bcd}
11	0	27.5	19	0.14±0.003 ^d	1.20±0.02 ^b	36.10±2.17 ^{ijk}	379.25±16.71 ^c	0.90±0.05 ^d	9.03±0.78 ^b	1.60±0.10 ^{ef}	18.31±0.49 ^{bcd}
12	0	27.5	19	0.13±0.006 ^d	1.20±0.05 ^b	35.47±1.37 ^{jk}	409.98±28.58 ^c	0.95±0.05 ^d	9.04±0.29 ^b	1.51±0.04 ^f	18.16±0.81 ^{bcd}
13	0	27.5	19	0.13±0.005 ^d	1.20±0.05 ^b	36.23±1.07 ^{ijk}	380.46±41.22 ^c	0.89±0.08 ^d	9.07±0.35 ^b	1.54±0.05 ^f	18.14±0.80 ^{bcd}
14	--	20	10	0.13±0.001 ^{defg}	1.39±0.05 ^a	39.71±0.49 ^{ghij}	570.00±17.00 ^a	1.09±0.07 ^{bc}	10.77±0.28 ^a	1.77±0.05 ^{cd}	22.05±2.46 ^a
15	+-	20	28	0.14±0.004 ^d	1.20±0.04 ^{bc}	45.13±1.82 ^{cde}	366.34±9.16 ^c	0.89±0.06 ^d	9.78±0.009 ^b	1.94±0.05 ^b	16.94±0.99 ^e
16	+-	35	10	0.12±0.008 ^{efg}	1.09±0.05 ^{de}	46.23±0.92 ^{cd}	375.02±6.36 ^c	0.97±0.04 ^{cd}	9.23±0.10 ^b	1.51±0.06 ^f	17.48±0.04 ^{de}
17	++	35	28	0.30±0.01 ^a	1.16±0.03 ^{bc}	57.42±0.42 ^a	390.53±32.46 ^c	1.33±0.03 ^a	9.34±0.38 ^b	1.93±0.05 ^b	17.47±0.49 ^{de}
18	a0	20	19	0.11±0.002 ^g	1.18±0.06 ^{bc}	40.23±0.21 ^{ghi}	443.40±22.11 ^b	0.84±0.003 ^d	9.63±0.23 ^b	1.55±0.05 ^f	19.01±0.41 ^b
19	A0	35	19	0.17±0.005 ^c	1.12±0.01 ^{cd}	49.44±0.41 ^b	384.51±10.74 ^c	0.90±0.002 ^d	9.45±0.63 ^b	1.50±0.02 ^f	18.04±0.66 ^{cd}
20	0a	27.5	10	0.13±0.011 ^{def}	1.04±0.01 ^e	36.03±1.53 ^{ijk}	438.64±33.43 ^b	1.11±0.05 ^b	9.65±0.21 ^b	1.72±0.12 ^{de}	16.98±0.45 ^e
21	0A	27.5	28	0.23±0.007 ^b	1.07±0.05 ^{de}	45.97±1.71 ^{cd}	491.55±50.40 ^b	1.31±0.01 ^a	9.77±0.15 ^b	2.13±0.04 ^a	18.67±0.42 ^{bc}
22	0	27.5	19	0.14±0.007 ^d	1.20±0.06 ^b	36.23±1.03 ^{ijk}	383.40±1.10 ^c	0.90±0.04 ^d	9.06±0.61 ^b	1.54±0.02 ^f	18.11±1.14 ^{bcd}
23	0	27.5	19	0.13±0.01 ^d	1.20±0.05 ^b	36.10±2.01 ^{ijk}	376.45±28.27 ^c	0.89±0.03 ^d	9.02±0.38 ^b	1.54±0.08 ^f	18.13±0.48 ^{bcd}
24	0	27.5	19	0.13±0.006 ^d	1.20±0.04 ^b	36.42±2.03 ^{hijk}	389.22±37.20 ^c	0.92±0.004 ^d	9.08±0.69 ^b	1.59±0.03 ^{ef}	18.11±0.75 ^{bcd}
25	0	27.5	19	0.14±0.004 ^d	1.20±0.09 ^b	36.91±1.97 ^{hijk}	392.43±1.49 ^c	0.95±0.009 ^d	9.05±0.54 ^b	1.51±0.08 ^f	18.16±0.46 ^{bcd}
26	0	27.5	19	0.13±0.02 ^{de}	1.19±0.09 ^b	35.47±1.88 ^{jk}	362.89±7.45 ^c	0.93±0.01 ^d	9.06±0.33 ^b	1.60±0.11 ^{ef}	18.15±1.26 ^{bcd}

Los datos corresponden a la media ± desviación estándar de dos replicas del experimento y analizadas cada corrida experimental por duplicado. Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas entre tratamientos (p<0.05). Las variables DPPHL, TEACL, FTL y AFL fueron evaluadas en extractos metanólicos. Las variables DPPHLIG, TEACLIG, FTLIG y AFLIG fueron evaluadas en extractos sometidos a hidrólisis alcalina.

En un estudio realizado por Dicko y col., (2005), en 50 variedades de sorgo, de manera general, no se encontró que la germinación a 27 ± 2 °C por 72h haya afectado el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Sin embargo, en algunas variedades si fueron observados incrementos importantes. Es posible que las variaciones en el contenido de fenoles y actividad antioxidante durante la germinación del sorgo, podría estar dado por la heterogeneidad en la que los compuestos fenólicos están distribuidos, así como también por las condiciones de germinación aplicadas.

Para el estudio de optimización solo fueron considerados los resultados obtenidos para las fracciones libres (FTL, AFL, DPPHL y TEACL), el estudio se enfocó hacia estas fracciones particularmente porque esta fracción de fenoles y ácido ferulico son las pueden estar bioaccesibles durante el proceso de digestión.

En la Tabla 9 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las variables respuesta analizadas. El valor de P, los coeficientes de determinación (R^2) y la falta de ajuste justifican la idoneidad del modelo. Los coeficientes de determinación para el modelo de fenoles totales libres fueron para fenoles totales ($R^2 = 0.97$), ácido ferúlico ($R^2=0.95$), DPPH ($R^2= 0.88$) y TEAC ($R^2= 0.90$). Estos coeficientes indican la bondad de ajuste del modelo predictivo y, en general, solo los valores superiores a 0.75 indican que el modelo estimado se ajusta a los datos experimentales con una buena predicción (Peñas y col., 2008). La existencia de la falta de ajuste ($p < 0.05$) por otro lado confirma la necesidad de ajuste del modelo de regresión.

La estimación de los coeficientes de regresión se muestran en la Tabla 9, todos mostraron significancia estadística ($p < 0.05$) a excepción del término cuadrático de la temperatura ($p > 0.05$), esto puede significar que los factores tiempo y temperatura siguen un comportamiento lineal con respecto a las variables respuesta es decir que a medida que aumenta el tiempo y temperatura aumentan los valores de las variables respuesta (comportamiento lineal), mientras que solo el tiempo muestra valores máximos a determinados valores de tiempo y temperatura para después disminuir (comportamiento cuadrático).

Tabla 9. Coeficientes de regresión de la ecuación polinomial cuadrática para fenoles totales libres, ácido ferúlico y actividad antioxidante.

Coeficientes de la ecuación	FT	DPPH	TEAC	Ácido Ferúlico
	mgEAG/g	μmolTE/g		μg/g
Intercepto				
β_0	0.3768***	1.105***	1.788***	142.31***
Lineal				
β_1	-0.00518 ***	0.0944 ***	0.0954***	-7.493***
β_2	-0.029505 ***	-0.17318 ***	0.16520***	-1.616***
Cuadrático				
β_{11}	-0.000040 ^{ns}	-0.002334***	-0.002169***	0.13818***
β_{22}	0.000452***	0.003127 ***	0.004202***	0.03760***
Interacción				
β_{12}	0.000644***	0.002240 ***	0.000832***	0.02485***
CV	4.77	4.60	3.39	3.61
Falta de ajuste	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0024
P-valor	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Prob > F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
R^2	0.97	0.88	0.90	0.95
R^2 Ajustada	0.97	0.88	0.89	0.94
R^2 Predicha	0.97	0.87	0.89	0.94

^{ns} no significativo (<0.05), *** Muy significativo (p <0.01).

β_1 Temperatura, β_2 Tiempo, β_{11} Temperatura², β_{22} Tiempo².

Mediante el uso del software estadístico Minitab 17 se calcularon los valores decodificados de cada uno de los factores de tiempo y temperatura para cada una de

las variables respuestas. De tal manera, mediante las ecuaciones de predicción (Tabla 10) fue posible establecer que, a 35°C y 28 horas de germinación, se obtuvo el mayor contenido de fenoles totales y ácido ferúlico. Para el caso de actividad antioxidante los valores predichos fueron de 33.6 °C y 28h para DPPH y 27.4 °C y 28h para TEAC. Las condiciones optimas establecidas por el modelo de regresión fueron sustituidas en las correspondientes ecuaciones. Los valores predichos de cada una de las variables respuesta fueron validados experimentalmente, demostrándose que la variabilidad entre los valores predichos y experimentales estuvo en el rango de 3-12% (Tabla 11). La prueba de validación confirmó que las condiciones sugeridas por el modelo de predicción mostraron los valores más altos de compuestos fenólicos, ácido ferúlico y actividad antioxidante.

La relación entre las variables independientes y dependientes se ilustra en las graficas tridimensionales de superficie de respuesta y de contornos generadas por los modelos de predicción (Figuras 11, 12, 13, 14 y 15).

Tabla 10. Ecuaciones de predicción para las diferentes variables respuesta.

Variable Respuesta	Ecuación de Predicción
FTL	$= 0.3768 - 0.00518X_1 - 0.029505X_2 - 0.000040X_1^2 + 0.000452X_2^2 + 0.000644X_1 \cdot X_2$
AF	$= 142.31 - 7.493X_1 - 1.616X_2 + 0.13818X_1^2 + 0.03760X_2^2 + 0.02485X_1 \cdot X_2$
DPPH	$= 1.105 + 0.0944X_1 - 0.17318X_2 - 0.002334X_1^2 + 0.003127X_2^2 + 0.002240X_1 \cdot X_2$
TEAC	$= 1.788 + 0.0954X_1 - 0.16520X_2 - 0.002169X_1^2 + 0.004202X_2^2 + 0.000832 X_1 \cdot X_2$

Para establecer una zona en la que pudieran converger todas las variables respuesta, se superpusieron los gráficos de contorno, de esta manera fue posible encontrar los

rangos de condiciones de tiempo y temperatura para todas las variables respuesta (Figura 15).

Tabla 11. Comparación entre el valor predicho y el valor experimental para FTL, AF, DPPH y TEAC.

Variables Respuesta	Punto Estacionario	Valor Predicho	Valor Observado
FTL (mgEGA/g)	Saddle	0.30	0.29 ± 0.009
AF (ug/g)	Saddle	57.21	50.1 ± 0.72
Actividad Antioxidante			
DPPH (µmET/g)	Saddle	1.35	1.53 ± 0.16
TEAC (µmET/g)	Saddle	2.08	2.19 ± 0.04

Se observó que el tiempo osciló entre 24 y 25.2 horas, mientras que la temperatura osciló entre 30 y 32 °C. Los valores predichos para estas condiciones fueron los siguientes: fenoles totales (0.20 - 0.23 mg EAG / g), ácido ferúlico (42.56- 47.04 µg / g), DPPH (1.08 - 1.14 µmol ET / g) y TEAC (1.74- 1.77 µmol ET / g).

Ya ha sido abordado por otros autores el estudio de factores de tiempo y temperatura de germinación como condiciones óptimas para aumentar el contenido de algunos fitoquímicos, sin embargo, existe cierta divergencia en los resultados obtenidos. Paucar y col., 2017a; 2017b; 2018) informaron estudios de germinación en los que evaluaron la temperatura y el tiempo de germinación como factores que maximizan la actividad antioxidante, fenólicos y GABA (ácido γ-aminobutírico), el resultado fue el siguiente: amaranto (26 ° C y 63 h), quinua (20 ° C y 42 h) y maíz azul (26 ° C y 63 h). Es relevante resaltar que para estos granos las temperaturas bajas combinadas con altos tiempos de germinación fueron las condiciones óptimas para obtener valores máximos de estos fitoquímicos.

Por otro lado, varios autores mencionan que, durante la germinación de la semilla, pueden ocurrir cambios dramáticos en su composición química, lo que refleja el flujo

dinámico y complejo de nutrientes y fitoquímicos, incluida la movilización, la degradación y la acumulación de los mismos. Por lo tanto, resulta un tanto complicado establecer comparaciones con otros estudios, con respecto a los factores que podrían afectar los compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos entre los diferentes granos de cereales.

Otro aspecto relevante del presente estudio fue que el proceso de germinación bajo las condiciones óptimas establecidas, mejoró el contenido total de fenoles (+181%), ácido ferúlico (+243%), DPPH (+66%) y TEAC (+37%) con respecto al sorgo no germinado.

Dicko y col., 2005, reportaron un estudio de germinación de 50 variedades diferentes de sorgo, se encontró que el contenido fenólico varió en respuesta a las condiciones de germinación (27 ° C / 72h), mostrando incrementos de hasta 65 y 75% en algunas variedades y una disminución del 24 y 37% en otras.

En otros cereales, como maíz azul, se observó que los valores máximos de fenoles totales se incrementaron 79%, actividad antioxidante por DPPH (148%), TEAC (192%) y ORAC (160%) a 26.9 ° C y 207.7 h (Chavarín-Martínez y col., 2019). Otro estudio de optimización de la germinación de amaranto concluyó que la actividad antioxidante medida como ORAC y TEAC y fenoles totales aumentó en hasta 300, 470 y 829%, respectivamente a condiciones óptimas de 30 ° C y 28 h en comparación con el amaranto no germinado (Perales-Sánchez y col., 2014). Kruma y col., 2019 concluyeron que el proceso de germinación de triticale, cebada y avena sin cascarilla, trigo y centeno aumentó el contenido total de fenoles y la actividad antirradicalaria de estos granos, observando que los cambios más significativos se observaron en los granos analizados durante germinación a 25 ° C y 35 ° C. Los compuestos fenólicos en todos los tipos de cereales analizados aumentaron, pero la dinámica dependía del tipo de cereal, y estos autores concluyeron que no es posible dar una tendencia general y los mejores parámetros aplicables para todos los cereales.

Se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre los cambios en los fenólicos durante el proceso de germinación. La temperatura es uno de los factores que pueden regular

la biosíntesis y el contenido de fenoles, el aumento de estos podría estar asociado con la adaptación de la semilla a los regímenes de temperatura, dando como resultado composiciones bioquímicas sinérgicas (Tesfay y col., 2016). La función principal de los fenoles es mantener la concentración estable de radicales libres, su función fisiológica se demuestra mediante la regulación del potencial redox celular (Shetty, 2004). Debido al alto metabolismo celular y la alta tasa de respiración que ocurre durante la germinación, la semilla es propensa a la acumulación de ROS (especies reactivas al oxígeno) (Tesfay y col., 2016). Debido a esto, los fenoles aumentan, siendo ubicuos en el sistema de la planta, incluidas las semillas; su producción podría asumir roles multifuncionales.

En este momento, no hay información en la literatura en relación a los efectos de la germinación sobre los fenoles totales y la actividad antioxidante del sorgo blanco. Hasta donde se sabe, este es el primer estudio de optimización de las condiciones de germinación para mejorar los fenoles totales, el ácido ferúlico y la actividad antioxidante.

El sorgo germinado se puede transformar en harina y cocinar para consumirlo como sopa o crema de sorgo. De esta manera, su inclusión como parte de una dieta saludable podría estar completamente justificada.

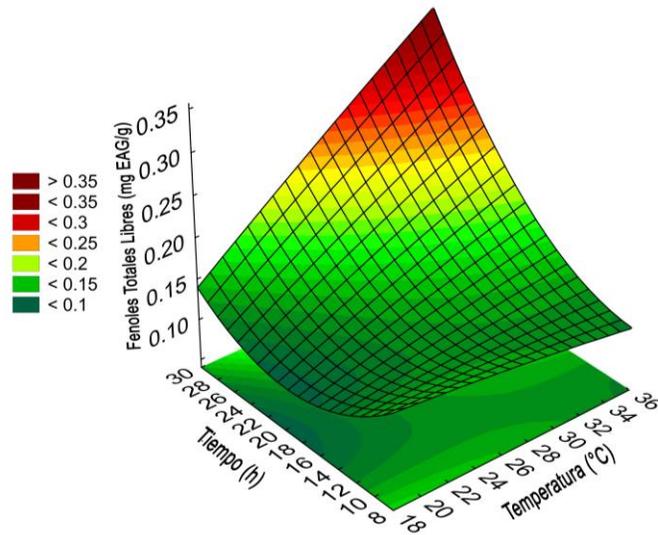


Figura 11. Superficie respuesta para la concentración de fenoles totales libres, expresados como mg EAG/g en función del tiempo y temperatura de germinación del grano de sorgo.

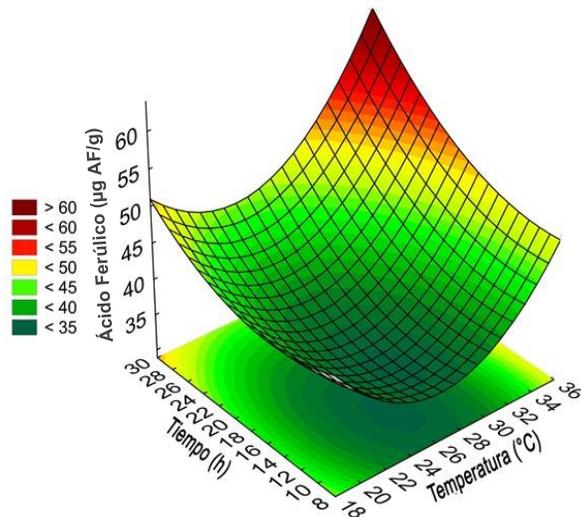


Figura 12. Superficie respuesta para la concentración de ácido ferúlico libre, expresado como µg ácido ferúlico/g en función del tiempo y temperatura en el grano de sorgo.

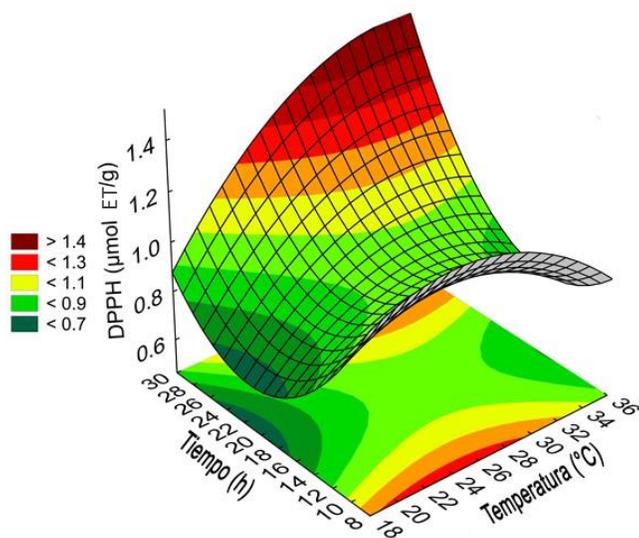


Figura 13. Superficie respuesta para la actividad antioxidante medida por DPPH en extractos metanólicos (fenoles libres), expresados como $\mu\text{m ET/g}$ en función del tiempo y temperatura de germinación en el grano de sorgo.

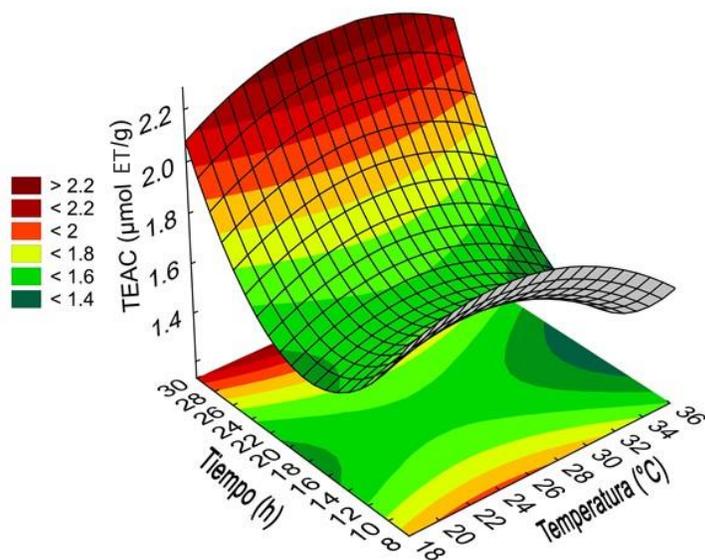


Figura 14. Superficie respuesta para la actividad antioxidante (TEAC), expresada como $\mu\text{m ET/g}$ en función del tiempo y temperatura de germinación en el grano de sorgo.

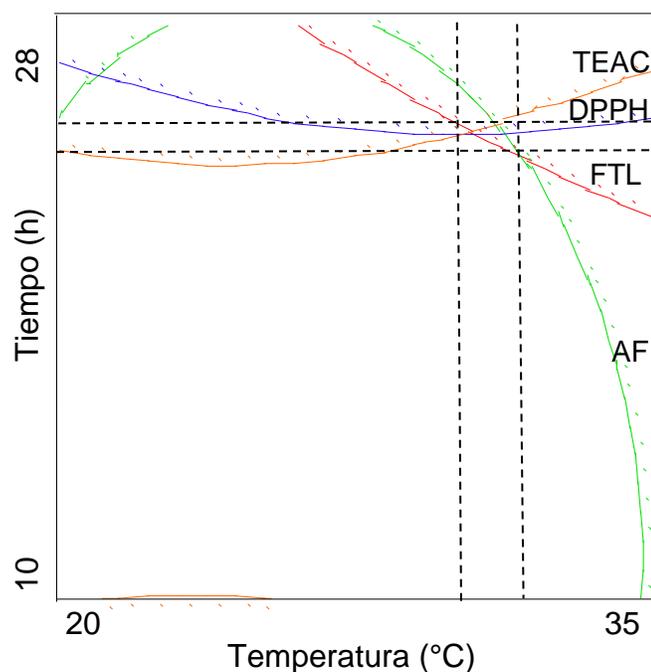


Figura 15. Zona de convergencia de gráficos de contorno de variables de respuesta en función del tiempo y temperatura de germinación, en sorgo germinado.

Aunque la dinámica de las paredes celulares de las plantas ha sido difícil de caracterizar debido, a las limitaciones técnicas y la complejidad estructural de sus componentes (Voiniciuc y col., 2018), se ha dilucidado que todas las células vegetales en crecimiento producen paredes primarias que se modifican dinámicamente, se reorganizan y se debilitan para permitir la relajación de la pared y la expansión celular controlada (Cosgrove, 2005). Esto indica que el alargamiento celular y la recuperación de azúcar resultante de la degradación de la pared celular, son procesos estrechamente correlacionados, pero aún queda por determinar si uno impulsa al otro (Barnes y Anderson, 2018).

En cereales, la composición química de las paredes celulares de la aleurona y endospermo se ha sido definida a detalle. Los β -1,3-1,4 arabinoxilanos y β glucanos en conjunto representan el 95% de los polisacáridos de la pared celular, con aproximadamente el 2% de celulosa y glucomanos (Fincher, 1992). Caspers y col.,

(2001) han descrito que la principal β -1,4 endoxilanasas en cebada se expresa hasta los 4 días de germinación. Sin embargo, las condiciones de temperatura (15°C) en la que se llevó a cabo la germinación, así como la composición estructural de la cebada difieren particularmente en el grano de sorgo. Por lo que analizar la presencia de esta enzima en el grano de sorgo, es de particular interés para esta investigación.

Actividad de β -1,4 Endoxilanasas y su Relación con el Contenido de Ácido Ferúlico

Para la evaluación de la actividad de la enzima se evaluaron las condiciones de tiempo (10, 19 y 28h) y temperatura (20, 27.5 y 35°C) utilizadas durante el proceso de optimización de la germinación anteriormente descrito.

De acuerdo con el análisis factorial, el factor temperatura, afectó significativamente la actividad enzimática ($p < 0.0001$). La prueba de medias de Tukey mostró diferencias significativas en las tres condiciones de temperatura, y en donde, la mayor actividad de la enzima fue de 27.5°C.

En lo que respecta al tiempo no se encontró un efecto significativo sobre la actividad de la enzima ($p > 0.05$). Sin embargo, la interacción de ambos factores mostró ser significativa ($p < 0.05$).

La actividad de la enzima β -1,4 Endoxilanasas en el sorgo se mostró variable con respecto a las diferentes temperaturas de germinación, de tal manera que, en granos de sorgo germinados a 20°C durante 19 horas, la actividad fue 50% más alta con respecto al grano control (sin germinar). Mientras que a 27.5 °C durante 28 h la actividad fue de 52% respecto al control, por otro lado, las condiciones de 35°C durante 28 h de germinación, no mostraron cambios significativos en la actividad de la enzima respecto al control (Figura 16).

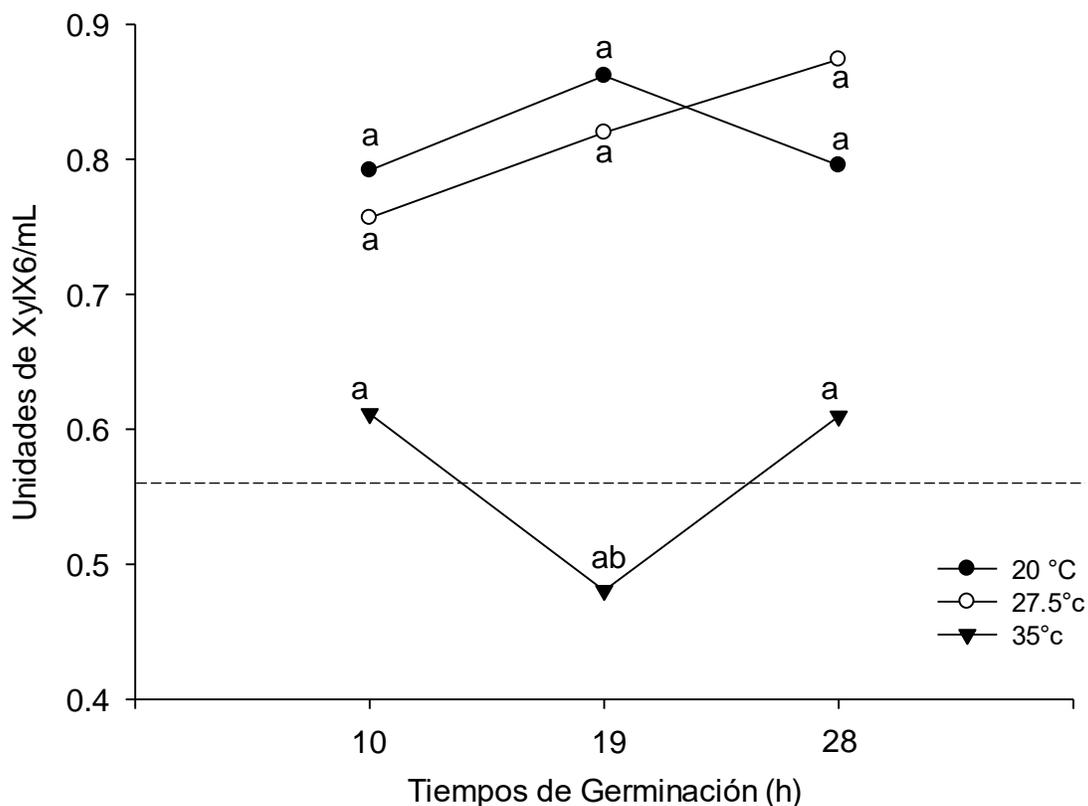


Figura 16. Efecto del tiempo y temperatura de germinación sobre la actividad de β -1,4 endoxilanasas.

Letras diferentes entre los puntos para una misma línea, indican diferencia significativa ($p < 0.05$).
 *La línea punteada representa la actividad de la enzima en sorgo sin germinar.

Diversos estudios han reportado el comportamiento de la actividad de la enzima endoxilanasas durante la germinación, los resultados han demostrado que esta actividad es variable dependiendo del grano y de las condiciones de germinación. Por ejemplo, Kołodziejczyk y Michniewicz, (2004) observaron que durante la germinación de centeno a 20°C la actividad de esta enzima se incrementó de manera exponencial durante las primeras 48 horas y posteriora este tiempo, la actividad se incrementó significativamente. Por su parte, Corder y Henry, (1989) en trigo, encontraron que la germinación durante 6 días a 16°C ocasionaba que la actividad de la endoxilanasas fuera lenta los primeros tres días y a partir de ahí el incremento fue considerable.

Aparentemente, bajas temperaturas de germinación (16-20°C) favorecen la actividad de la enzima endoxilanas, no obstante, se ha reportado que este tipo de enzima puede presentar actividad hasta los 40-60°C (Subramaniyan y Prema 2002; Sunna y Antranikian, 1997). Lo que no concuerda con los resultados de este estudio en donde a una temperatura de 35°C se mostró baja actividad de esta enzima.

De acuerdo con Guzmán-Ortiz y col., (2019), la actividad enzimática aumentará, sin embargo, ésta no ocurrirá de la misma manera en todos los cereales y dependerá del tipo de enzima y las condiciones de germinación como temperatura, tiempo de remojo y la variedad.

Posiblemente la combinación de cortos tiempos de germinación y temperaturas altas como las utilizadas en este estudio, promovieron que la actividad de la enzima se expresara en las primeras horas de germinación, para posteriormente disminuir su actividad al final de esta (28 horas). Pudiera suponerse que a la temperatura de 35°C la actividad de la enzima endoxilanas estuviera relativamente alta, no obstante, puede haber algunas situaciones atribuidas al proceso de germinación que modificaron este comportamiento. Este hecho puede atribuirse a la existencia de dos isoenzimas de la endoxilanas, las isoenzimas XI y XII (Van Campenhout y Volckaert, 2005). La isoenzima XI, es considerada la principal β -1,4 endoxilanas liberada exclusivamente por la capa de aleurona y escutelo, observado durante la germinación de cebada. La isoenzima XII, se expresa germinación avanzada y se acumula en el brote en desarrollo y en la raíz del embrión durante la germinación. Desde la planta joven hasta la madura, solo se expresará este tipo de isoenzima.

Se puede sugerir que la actividad de la enzima evaluada a 35°C, correspondió a la isoenzima XI la cual degradó rápidamente las estructuras que contenían al endospermo, lo que consecuentemente provocó una disminución en su actividad. Esta teoría puede ser respaldada, debido a que durante ésta temperatura, la germinación se vio acelerada, donde, se presentaba una amplia longitud de radícula y plúmula. (Van Campenhout y Volckaert, 2005).

En los cereales se requiere la acción de la xilanasa endógena para la remodelación controlada de la pared celular de la planta durante el crecimiento y desarrollo. Además, la degradación de la pared celular durante la germinación asegura que otras enzimas hidrolíticas, secretadas por la aleurona o escutelo, puedan alcanzar al almidón y proteínas (Simpson y col., 2003). Sin embargo, la acción de la β -1,4 endoxilanasas se ve acompañada de enzimas capaces de degradar los arabinoxilanos y a sus constituyentes durante la germinación de cereales, incluyendo a las arabinofuranosidasas, endoxilanasas, exoxilanasas, y xilobiosas (o B-xilopiranosidasas) (Preece y MacDougall, 1958; Taiz y Honigman, 1976).

Durante esta actividad enzimática se puede tener como resultado la liberación de compuestos fenólicos y ácido ferúlico, que pudiera estar ligado, atrapado o conjugado a las diferentes estructuras poliméricas de las paredes celulares.

Dado el interés de conocer el comportamiento de la enzima endoxilanasas, en función del máximo contenido de ácido ferúlico en sorgo reportado a partir del proceso de optimización, y tomando en cuenta que las condiciones óptimas fueron de 28h y 35°C, es posible establecer que la máxima concentración de ácido ferúlico correspondió a una mínima actividad de la enzima endoxilanasas cuantificada a las mismas condiciones de germinación. Como mencionan Guzmán-Ortiz y col., (2019), los estudios sobre la actividad de la xilanasa durante la germinación son limitados. En el caso particular del grano de sorgo, no se tiene conocimiento de la evaluación en la actividad de endoxilanasas durante la germinación y la liberación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Solamente se tiene el conocimiento de la relación en la cantidad de compuestos fenólicos con enzimas como la peroxidasa y polifenol oxidasas, donde, no se pudo establecer una correlación clara entre los criterios cuantitativos de composición del grano en compuestos fenólicos, peroxidasa, polifenol oxidasas y la resistencia de la planta a patógenos (Dicko, M. H y col., 2002).

Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos

La harina de sorgo germinado (HSG) promovió cambios significativos en la liberación de compuestos fenólicos durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* en comparación con la harina de sorgo sin germinar. En la Tabla 12 se muestra el contenido de fenoles totales para cada una de las etapas de la digestión. Se observó que el contenido de fenoles totales se incrementó en la digestión gástrica, para ambas muestras.

Tabla 12. Contenido de fenoles totales (mg EAG/g) en cada una de las fases de digestión *in vitro* de sorgo germinado comparado con sorgo no germinado.

MUESTRA	ORAL	GÁSTRICA	INTESTINAL	Bioaccesibilidad
				(%)
mg EAG/g				
Sorgo no Germinado	0.11±0.009 ^b	1.75±0.14 ^a	0.13±0.001 ^b	5.8
Sorgo Germinado	0.47±0.02 ^a	1.73±0.11 ^a	0.23±0.01 ^a	9.3

Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones ±desviación estándar. Valores con letra diferente entre columnas son significativamente diferentes a una $p < 0.05$.

La bioaccesibilidad se calculó considerando el contenido de compuestos fenólicos en la fase intestinal en relación con el contenido de fenoles totales en un gramo de muestra (fenoles libres + fenoles ligados). Fenoles totales en sorgo no germinado (2.20mg EAG/g); Fenoles totales en sorgo germinado (2.53mg EAG/g).

Las distintas fases de la digestión presentaron un comportamiento distinto con relación a la liberación de los compuestos fenólicos para ambas muestras. La digestión oral del sorgo germinado promovió una mayor liberación de compuestos fenólicos, siendo 4.2 veces más la concentración con respecto al no germinado. La digestión gástrica mostró un incremento en la liberación de compuestos fenólicos sin diferencias significativas entre ambas muestras de sorgo. Durante la digestión intestinal se observó una reducción de los compuestos fenólicos respecto a la digestión gástrica. La digestión intestinal de sorgo germinado promovió una mayor concentración de

compuestos fenólicos, siendo alrededor de 1.7 veces más alta que en el sorgo no germinado.

El porcentaje de bioaccesibilidad de fenoles totales para el sorgo germinado fue de 9.3%, mientras que, para el no germinado, la bioaccesibilidad fue de 5.8%. Lo que correspondió a un 60.3% de incremento de la bioaccesibilidad. Hasta donde se sabe, este es el primer estudio en el cual se evalúa la bioaccesibilidad de sorgo germinado bajo condiciones de simulación gastrointestinal.

Durante el proceso de digestión gastrointestinal, se presentan una serie de eventos fisicoquímicos, que eventualmente van a afectar la solubilización de los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos pueden abarcar un grupo muy extenso de sustancias que pueden dar positiva la reacción de Folin, entre estas pueden mencionarse algunas proteínas, azúcares, aminoácidos, vitaminas y todos aquellos compuestos que tengan en su estructura un anillo fenólico (Prior y col., 2005). Esta situación conduce a una mayor complejidad en el comportamiento que siguen estos compuestos durante el proceso de digestión. La saliva humana contribuye de manera significativa al proceso de digestión de alimentos, no obstante, se ha reportado que la composición química de este fluido, predominantemente de naturaleza proteica, interfiere en la solubilización de los fenoles (Lu y Bennick., 1998; Prinz y Lucas., 2000; Rawel y col.,2006). Por ejemplo, se ha sugerido que los polifenoles se unen fuertemente a las histatinas, proteínas salivales que contienen una alta proporción de residuos de histidina (Soares y col., 2007). Por otro lado, Ginsburg y col., (2012) sugieren que la saliva es importante para la solubilización de los polifenoles presentes en las frutas y bebidas vegetales, lo que aumenta sustancialmente su disponibilidad. Sin embargo, debido a la interacción generalmente muy corta de las enzimas orales con el bolo alimenticio antes de llegar al estómago, su influencia es mucho menos clara y más bien limitada a los alimentos ricos en carbohidratos, como los alimentos a base de cereales (Hur y col., 2011).

Por otra parte, la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos también puede verse afectada por su interacción con enzimas digestivas como la pepsina. Esta interactúa

con el ácido clorogénico formando un complejo pepsina clorogénica a través de fuerzas de Vander vals en el área de la cavidad hidrofóbica. Así los enlaces de hidrógeno cambian la conformación de la pepsina dando como resultado la inhibición de esta (Zeng y col., 2014).

Así mismo, la presencia de otros componentes del alimento puede alterar la estabilidad del polifenol. Después de la ingesta de alimentos (simulación), la oxidación de los lípidos puede ocurrir debido al contacto cercano entre el hierro de la dieta, el dióxígeno y los lípidos emulsionados. Esto se demostró para las formas de hierro hemo (metamioglobina) y hierro no hemo (Fe^{II}/Fe^{III}) en sistemas de emulsión que modelan el estado físico de los triacilgliceroles (Lorrain y col., 2012). En este caso, la actividad antioxidante de los polifenoles depende de un agente emulsionante, como por ejemplo proteínas, fosfolípidos y pH, lo que puede dar lugar a productos de oxidación que a su vez retienen propiedades antioxidantes (Lorrain y col., 2009). Por lo que, el nivel de O_2 disuelto aumentado durante la masticación de los alimentos, puede afectar la estabilidad fitoquímica y micronutriente en el tracto gástrico (Gorelik y col., 2005). Igualmente, en condiciones casi neutrales y en presencia de oxígeno algunos compuestos fenólicos pueden degradarse por oxidación no enzimática (Bergmann y col., 2009). Por lo que, algunos autores sugieren el lavado con nitrógeno o argón durante unos minutos para reducir los niveles de O_2 disuelto antes del inicio de la digestión simulada (Bermúdez-Soto y col., 2007).

Además, el comportamiento de los compuestos fenólicos en diferentes condiciones de pH es particularmente importante para la formación de complejos con proteínas, debido al hecho de que, durante el proceso de digestión los polifenoles se exponen tanto a un ambiente fuertemente ácido (durante la digestión gástrica), como un ambiente alcalino (durante la digestión en el duodeno), que también puede afectar su estabilidad y solubilidad (Czubinski y col., 2014).

Cabe señalar que, en matrices altamente procesadas, algunos polifenoles se liberan hasta casi el 100% en la fase gástrica, como pueden ser los jugos de frutas, vinos, té verde o extractos fenólicos, en presencia de jugos gástricos simulados (pH 1.7 a 2.5,

pepsina, 1 a 4 h), (Pérez-Vicente y col., 2002; McDougall y col., 2005a; McDougall y col., 2005b; Bermúdez-Soto y col., 2007; Green y col., 2007; McDougall y col., 2007; Gumienna y col., 2011).

No obstante, Pellegrini y col. (2017), encontraron que el contenido de fenoles totales en quinua después de la digestión gástrica e intestinal era mayor que en las obtenidas de las muestras no digeridas y después de la fase oral. Por lo que las condiciones estructurales como ambientales de las matrices alimentarias, afectarán ampliamente la liberación de compuestos fenólicos y su bioaccesibilidad. Además, Salazar-López y col., (2018) estudiaron el salvado de sorgo aplicando tratamientos térmicos y obtuvieron resultados similares en el contenido de fenoles totales, aumentando conforme se avanzó el proceso de digestión. Esto también concuerda con Anson., y col., (2009b), donde, el bioprocesamiento del salvado de trigo puede mejorar significativamente la bioaccesibilidad de los ácidos fenólicos en panes integrales en la etapa de digestión intestinal.

Por otra parte, Hithamani y Srinivasan, (2014b) encontraron que en algunos cereales (trigo, mijo, sorgo), el contenido de polifenoles bioaccesibles sometidos a varios procesos tecnológicos (brotación, asado, horno abierto, cocción a presión, cocción abierta y calentamiento por microondas) no cambiaron significativamente ($p < 0.05$) o disminuyeron su accesibilidad.

Bioaccesibilidad del Ácido Ferúlico

Del grupo de los ácidos hidroxicinámicos, el ácido ferúlico es el compuesto fenólico predominante en sorgo, alrededor del 95% se encuentra enlazado a polisacáridos no almidonados y existe un creciente interés por liberar este compuesto de estas estructuras de tal manera que pueda estar más bioaccesible para su absorción (Awika y Rooney, 2004; Salazar-López y col., 2016).

Si bien, las condiciones de germinación establecidas al inicio del presente estudio promovieron una mayor liberación de ácido ferúlico, fue importante investigar si esta liberación promovida por el proceso de germinación pudiera verse reflejada en un

modelo de digestión *in vitro*. En la Tabla 13 es posible observar que el contenido del ácido ferúlico en cada uno de los digestos se comportó de una manera diferente al de los compuestos fenólicos. En este caso se observó que, para muestras de sorgo no germinado, el contenido de ácido ferúlico disminuyó conforme transcurrió la digestión, mientras que el proveniente de la digestión de sorgo germinado se mantuvo con valores constantes, pero más altos que los de sorgo no germinado. De la misma manera se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras de sorgo en cada una de las etapas de la digestión. Durante la digestión oral se encontró un contenido de ácido ferúlico de $12.04 \pm 0.51 \mu\text{g/g}$ en las muestras de sorgo germinado, representando un valor de 5.18 veces más alto en relación con las del sorgo no germinado. Durante la digestión gástrica el contenido de ácido ferúlico, proveniente del sorgo germinado mostró valores hasta de 8.51 veces más alto, mientras que en la fase de digestión intestinal el contenido fue hasta 11.27 veces más alto que la harina de sorgo sin germinar (Tabla 13). Con estos resultados es posible asumir que las harinas de sorgo germinado promovieron una mayor liberación de ácido ferúlico durante la digestión intestinal, con respecto a las harinas de sorgo no germinado. Con los resultados de la digestión intestinal se calculó el porcentaje de bioaccesibilidad de ácido ferúlico para cada una de las muestras, observándose que el sorgo germinado obtuvo un 3.43% de bioaccesibilidad en comparación con el sorgo sin germinar que fue de 0.62%. Aparentemente el proceso de digestión gastrointestinal bajo condiciones simuladas favoreció la liberación de ácido ferúlico en muestras germinadas (+453.2%), impactando significativamente la bioaccesibilidad de este compuesto. Es importante considerar por una parte que las condiciones de digestión juegan un papel preponderante en la liberación de compuestos bioactivos. No obstante, es importante resaltar que el proceso de germinación del sorgo pudo potencializar la liberación del ferúlico durante la digestión. Esto es atribuido particularmente a que durante la germinación se presentan procesos degradativos que pudieron haber simplificado estructuras complejas y así facilitar el proceso de digestión (Barnes y Anderson, 2018; Franková y Fry, 2013; Nonogaki y col., 2010).

En un estudio realizado por Hithamani y Srinivasan, (2014b) en brotes de mijo, lograron aumentar la bioaccesibilidad del ácido ferúlico hasta en 820%, del ácido siríngico 127%, mientras que el ácido p-coumarico y el ácido sinápico disminuyeron hasta un 15 y 67%, respectivamente.

Tabla 13. Contenido de ácido ferúlico libre durante el proceso de digestión *in vitro* en sorgo germinado comparado con sorgo no germinado.

MUESTRA	ORAL	GÁSTRICA	INTESTINAL	Bioaccesibilidad (%)
	µg/g			
No Germinado	7.22±0.21 ^b	5.14±0.51 ^b	2.24±1.52 ^b	0.62
Germinado	12.40±0.51 ^a	13.65±0.49 ^a	13.51±2.27 ^a	3.43

Los valores corresponden a la media (n=3) ± desviación estándar. Valores con letra diferente entre columnas, son significativamente diferentes a una p<0.05.

La bioaccesibilidad se calculó considerando el contenido de ácido ferúlico en la fase intestinal en relación con el contenido de ácido ferúlico en un gramo de muestra (ácido ferúlico libre + ácido ferúlico ligado). Ácido ferúlico total en sorgo no germinado (357.20 µg/g); Ácido ferúlico total en sorgo germinado (394.03 µg/g).

Se ha demostrado que la bioaccesibilidad de los ácidos hidroxicinámicos podría atribuirse a varios factores, como sus interacciones con los componentes de la matriz alimentaria (proteínas, lípidos, carbohidratos), a la naturaleza química de estos compuestos (dímeros, trímeros, oligómeros) y su estabilidad a lo largo de la digestión gastrointestinal (Domínguez-Avila y col., 2017; Jakobek 2015; Anson y col., 2009a, b; Sun y col., 2016; Salazar-López y col., 2018). Además, según Salazar-López y Quirós-Sauceda y col., (2014), en el proceso de adsorción se pueden formar diferentes interacciones fisicoquímicas entre polisacáridos complejos y ácidos hidroxicinámicos a través de puentes de hidrógeno, enlaces éster, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes o simplemente por atrapamiento físico. Así mismo, el número y la posición de los grupos hidroxilo o la carga nativa de los compuestos fenólicos son factores

determinantes para las interacciones que se pueden presentar (puentes de hidrogeno, no covalentes e hidrofóbicos) (Domínguez-Avila y col., 2017 ; Jakobek, 2015; Phan y col., 2015).

En un estudio sobre digestibilidad de proteínas de sorgo, se menciona que el ácido ferúlico puede formar reticulaciones de naturaleza proteica, atribuyendo estos a procesos oxidativos que se puedan presentar durante la digestión. Por otra parte, es posible que el ácido ferúlico por un proceso oxidativo tenga la capacidad de acoplarse a un arabinosilano ferulado (Duodu y col., 2003; Fry, 1988), impidiendo su solubilización, y por lo tanto su cuantificación.

De manera similar, Bacic y col., (1988), han sugerido que puede ocurrir dimerización entre residuos de tirosina en proteínas y residuos de ácido ferúlico en arabinosilanos. De tal manera que es posible asumir que, durante el proceso de simulación gastrointestinal *in vitro*, debido a la presencia de oxígeno podría conducir a la formación de reticulaciones de tirosil-feruloilo entre proteínas y arabinosilanos. Lo anterior pudiera explicar el hecho de que se haya obtenido una baja bioaccesibilidad del ácido ferúlico, sin embargo cabe destacar que otros estudios realizados en salvado de sorgo extrudido mostraron porcentajes de bioaccesibilidad de alrededor del 1% (Salazar y col., 2016).

Capacidad Antioxidante

Los efectos sobre la capacidad antioxidante del sorgo germinado y sin germinar durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, se cuantificaron mediante los ensayos de capacidad de captación de radicales DPPH y TEAC (Figura 17 y 18).

La actividad antioxidante en los digestos analizados por DPPH fue significativamente más alta ($p < 0.05$) en las muestras de sorgo germinado para todas las etapas de la digestión. Particularmente, en la fase intestinal se encontró la mayor actividad antioxidante. Estos resultados mostraron un comportamiento similar al presentado durante la digestión del ácido ferúlico. Lo que pudiera sugerir que es este ácido el que

podiera estar contribuyendo en parte a la actividad antioxidante encontrada durante el proceso de digestión.

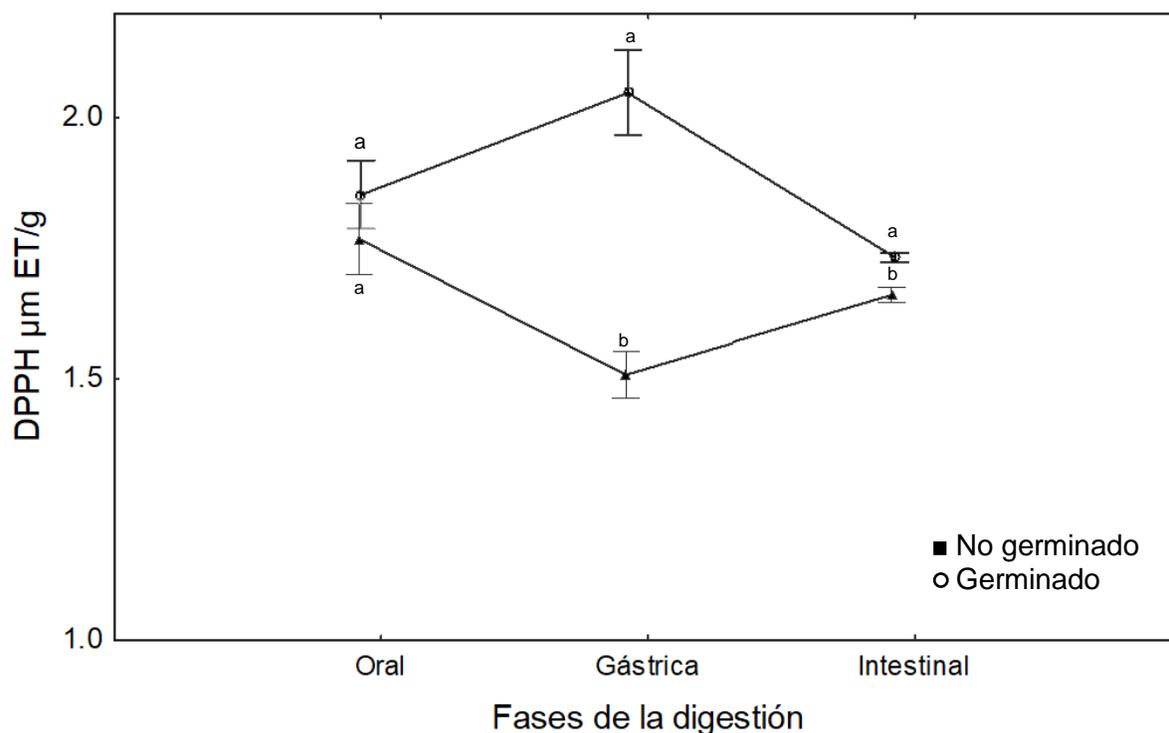


Figura 17. Actividad antioxidante por DPPH ($\mu\text{mol ET/g}$) durante el proceso de digestión *in vitro* en sorgo germinado comparado con sorgo no germinado

Los valores corresponden a la media de 3 repeticiones \pm la desviación estándar. Valores con letra diferente entre tratamientos, son significativamente diferentes a una $p < 0.05$.

La actividad antioxidante analizada en los digestos por TEAC, mostró un comportamiento diferente al presentado en el ensayo de DPPH, no obstante, las fluctuaciones entre cada una de las etapas de la digestión y para ambas muestras, el valor más alto se presentó en la etapa de digestión intestinal para las muestras de sorgo germinadas.

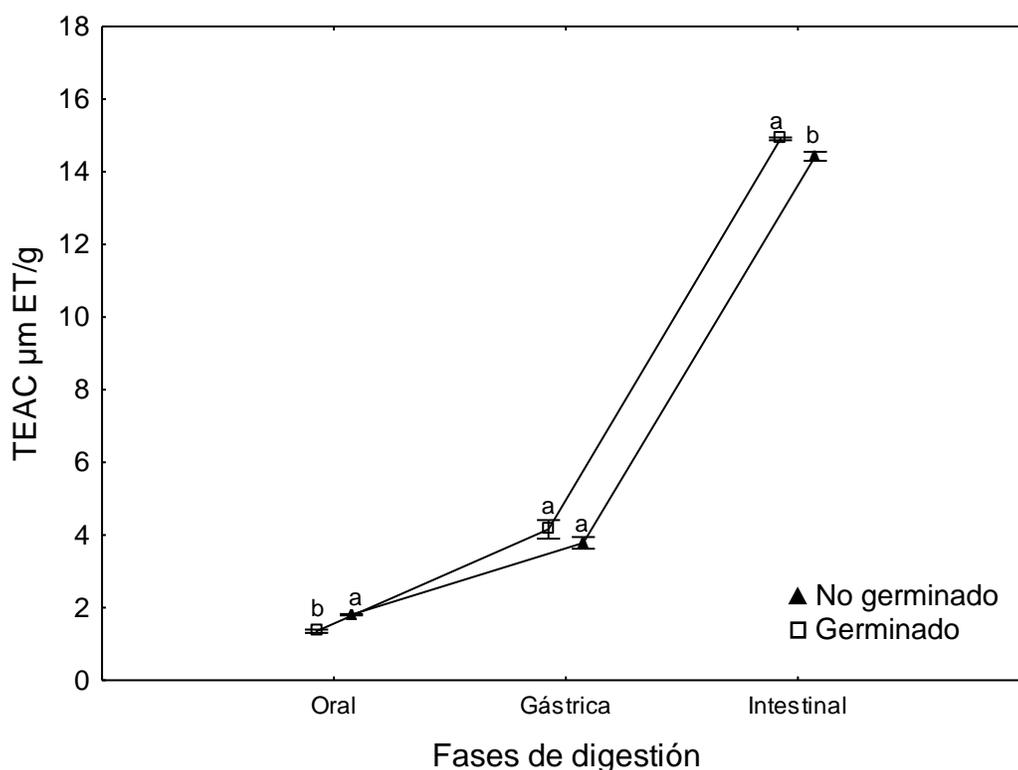


Figura 18. Actividad antioxidante por TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$) durante el proceso de digestión *in vitro* en sorgo germinado comparado con sorgo no germinado.

Los valores corresponden a la media de 3 repeticiones \pm la desviación estándar. Valores con letra diferente entre tratamientos, son significativamente diferentes a una $p < 0.05$.

Durante el proceso de germinación se pueden sintetizar o transformar diversos compuestos bioactivos, tales como vitaminas, ácido γ -aminobutírico (GABA) y polifenoles (Gan y col., 2017). Estos compuestos pueden presentar actividad antioxidante, sin embargo, una vez que se someten a un proceso de digestión puede dar lugar a su degradación o biotransformación (Gan y col., 2017).

Son realmente escasos los estudios en los cuales se ha evaluado el potencial antioxidante de digestos de sorgo, particularmente en sorgo germinado, no ha sido reportado el efecto de este proceso sobre la actividad antioxidante en un modelo de digestión *in vitro*. No obstante, existen evidencias en relación con que otros procesos tecnológicos aplicados en cereales o en otras semillas, pueden mejorar el potencial biológico. En un estudio llevado a cabo en arroz integral sometido a germinación y

posterior aplicación de altas presiones hidrostáticas, se demostró que mediante un proceso de digestión *in vitro* la actividad antioxidante aumentó a medida que se incrementaba la presión hidrostática (Xia y col., 2017).

Diseño de un Alimento con Potencial Funcionalidad Biológica

El contenido de fenoles totales en las cremas comerciales y de la HSG mostró variabilidad estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Figura 19). La crema formulada con harina de sorgo germinado mostró el mayor contenido de fenoles totales (0.47 ± 0.013 mg EAG/g peso seco), comparado con la crema de sorgo no germinado. Las cremas comerciales mostraron valores más bajos comparado con las cremas de sorgo (no germinado) de aproximadamente un 17%, 28 y 7% para AC1, AC2 y AC3, respectivamente.

Los bajos valores de fenoles libres en las muestras comerciales puede deberse en primera instancia a que tanto trigo como maíz poseen niveles bajos de fenoles totales en comparación con el sorgo. Por otra parte se ha reportado que el tamaño de partícula puede influir en la cuantificación de fenoles totales, en el caso de las cremas comerciales aunque no se midió el tamaño de partícula, visualmente si mostraban mayor tamaño comparado con la crema de sorgo. Zhou y col., (2004) mencionan que el tamaño de partícula de las harinas en cereales son un factor importante en la cuantificación del contenido de fenoles, ya que esto aumenta el área de superficie de la matriz y, por lo tanto, aumentan la accesibilidad de los disolventes de extracción.

Por otra parte, se sabe que la sémola de trigo o el trigo duro forman parte importante de las cremas comerciales, lo que pudiera promover un efecto de dilución de los compuestos fenólicos. Además, Nicoletti y col., (2013) mencionan que la sémola de trigo es la fracción que presenta menor cantidad de ácidos fenólicos libres, lo que también podría explicar el bajo contenido de fenoles libres detectados anteriormente.

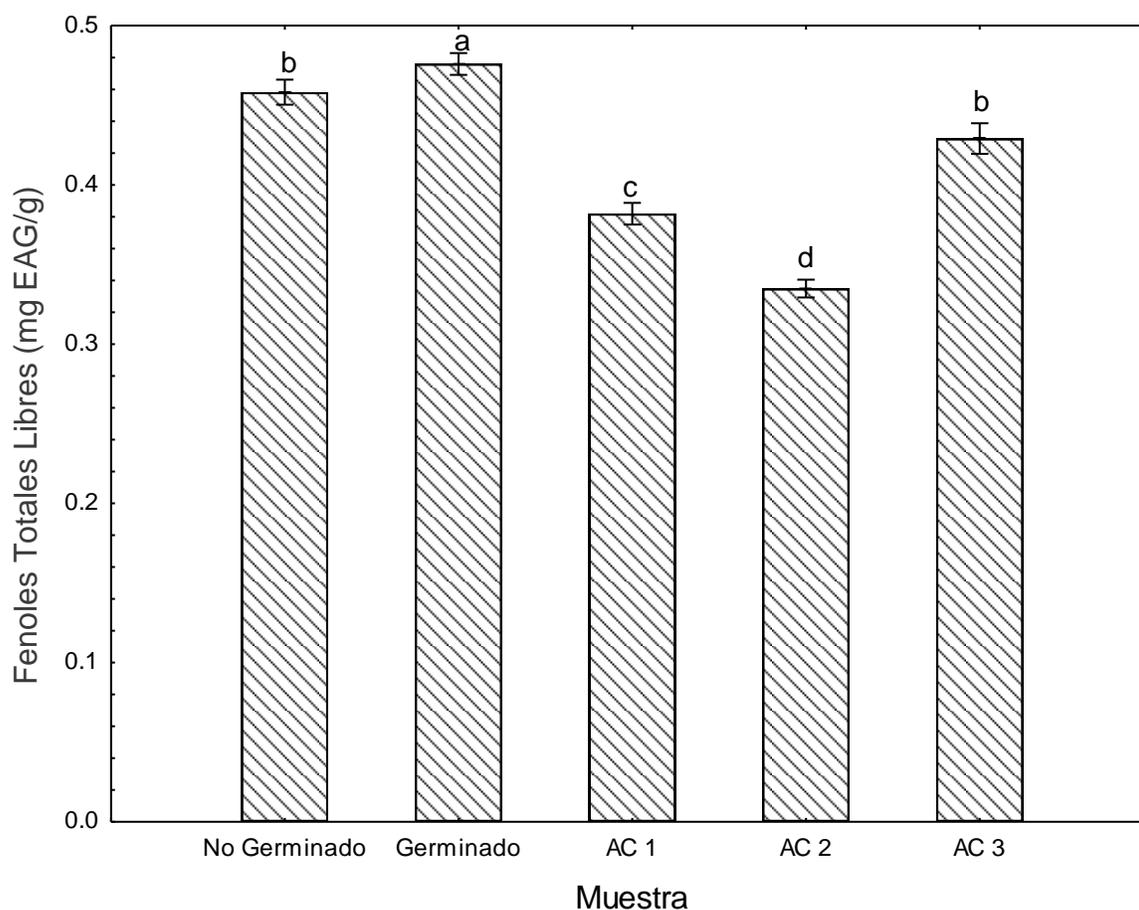


Figura 19. Contenido de fenoles totales libres en cremas de harina de sorgo germinado y no germinado comparado con cremas comerciales de trigo (AC1, AC2) y maíz (AC3).

Las barras corresponden a los valores promedio (n=3) la desviación estándar. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En las Figura 20 y 21 se muestran los resultados de actividad antioxidante evaluada por los ensayos de DPPH y TEAC. Es posible observar que la actividad antioxidante evaluada en las cremas comerciales y experimentales mostró alta correlación ($R^2 = 92, 89; p < 0.0001$) con los resultados del contenido de fenoles totales. La crema elaborada a base de harina de sorgo germinado mostró la más alta actividad antioxidante, mientras que las comerciales los valores más bajos.

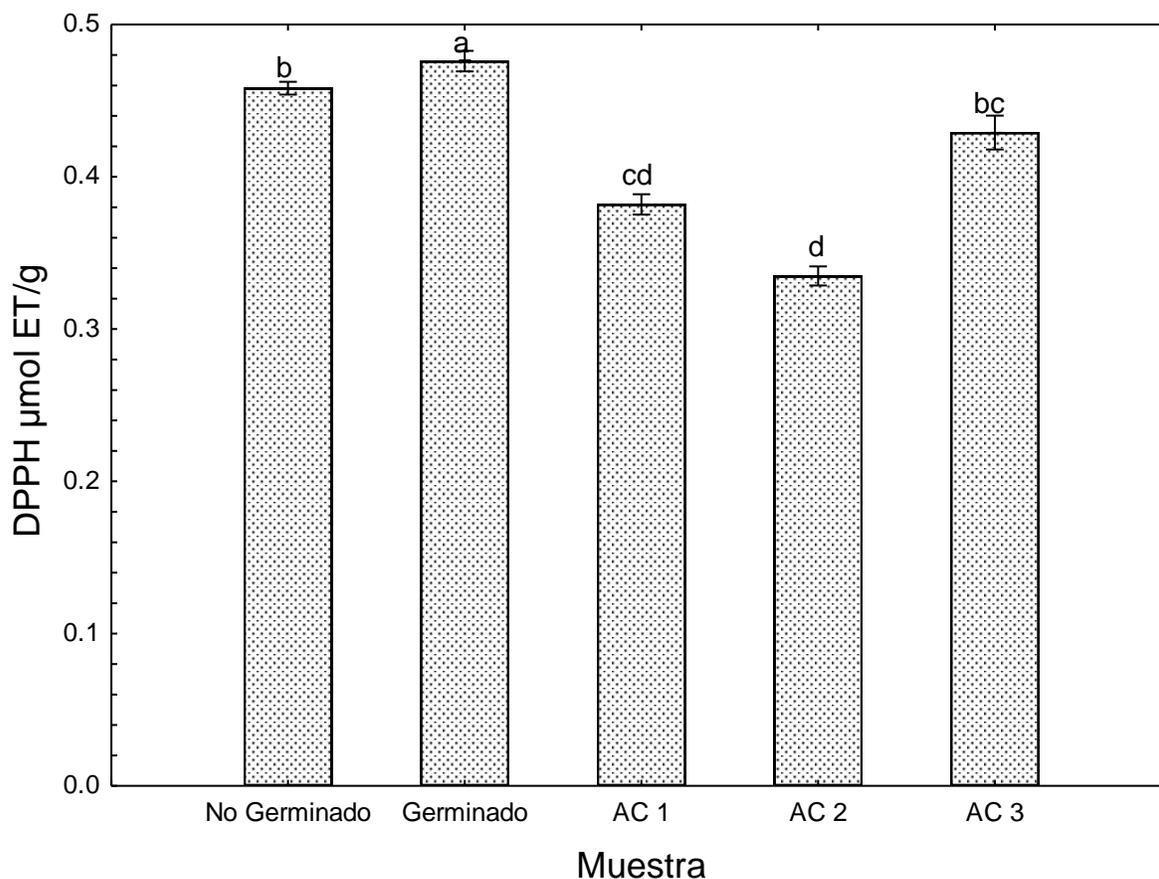


Figura 20. Actividad antioxidante por DPPH en cremas comerciales y de sorgo germinado y sin germinar.

Las barras corresponden a los valores promedio ($n=3$) la desviación estándar. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p<0.05$).

Debido a su composición química (trigo duro y sémola), las cremas comerciales presentaron menor actividad antioxidante. La baja cantidad de fenoles libres y ácido ferúlico son indicadores del potencial antioxidante que puede presentar un alimento. Según Esposito y col., (2005), en un estudio con trigo duro, todas las fracciones de salvado presentaron marcada una actividad antioxidante en comparación con la sémola que presenta una insignificante actividad antioxidante.

Por otra parte, el proceso de cocción afectó de manera significativa el contenido de fenoles y actividad antioxidante. Los resultados del presente estudio mostraron que el proceso de cocción de la harina integral de sorgo sin germinar incrementó el contenido

de compuestos fenólicos aproximadamente un 98%, mientras que la actividad antioxidante evaluada como DPPH, mostró de igual manera un incremento de alrededor del 95%.

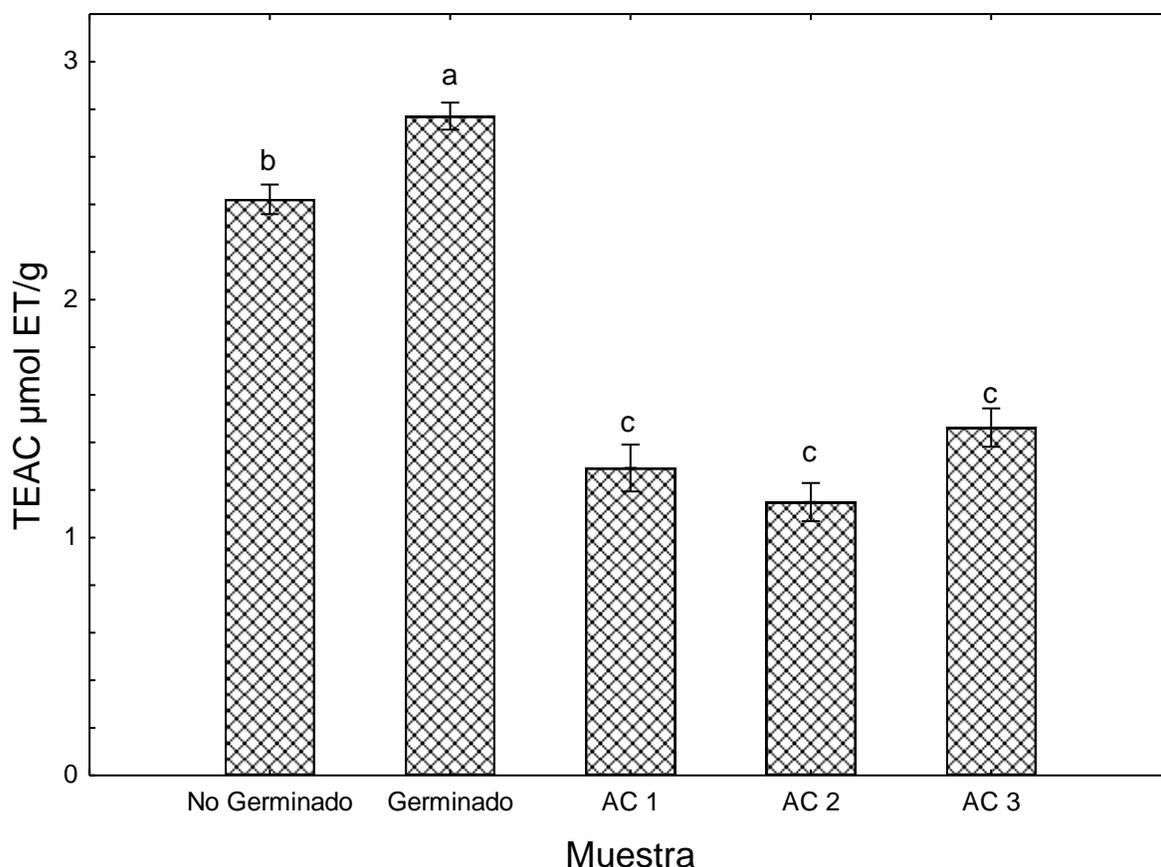


Figura 21. Actividad antioxidante por TEAC en cremas comerciales y de sorgo germinado y sin germinar.

Las barras corresponden a los valores promedio ($n=3$) la desviación estándar. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p<0.05$).

Por otra parte, es importante mencionar que el proceso de cocción de las harinas de sorgo germinado, afectó positivamente el contenido de fenoles totales mostrándose un aumento del 61.6% posterior al proceso de cocción (Tabla 14).

Tabla 14. Efecto de la cocción de harina de sorgo germinada y sin germinar en el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Sorgo	Fenoles Libres mgEAG/g*	DPPH Libre µmET/g*	TEAC Libre µmET/g*
No germinado (G-)	0.112±0.004 ^{bB}	0.813±0.008 ^{bB}	1.512±0.102 ^{bB}
Germinado (G+)	0.297±0.020 ^{aB}	1.323±0.040 ^{aB}	1.922±0.082 ^{aB}
No germinado Cocido (G-C+)	0.222±0.003 ^{bA}	1.587±0.123 ^{bA}	2.42±0.25 ^{bA}
Germinado cocido (G+C+)	0.480±0.01 ^{aA}	1.863±0.019 ^{aA}	3.63±0.03 ^{aA}

^a Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre G- y G+, G-C+ y G+C+

^A Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre G- y G-C+, G+ y G+C+

* Se muestra la desviación estándar de tres repeticiones.

Los tratamientos térmicos de alta humedad aplicados a ciertos alimentos pueden conducir a cambios importantes en la matriz alimentaria, tanto físicos como químicos. Particularmente se ha estudiado como afecta la cocción de algunos alimentos al contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Un estudio llevado a cabo por Towo y col., (2003), demostró que el proceso de cocción en grano de sorgo durante 15 minutos, redujo 21% el contenido de fenoles totales. En otro estudio N'Dri y col., 2013, evaluaron el efecto del proceso de cocción en sorgo, reportando que los fenoles libres y ligados disminuyeron significativamente después de la cocción por 12 minutos a 100°C. Además, Zielinski y col., (2001) notaron cambios significativos en el contenido de ácido fenólico de trigo, cebada, centeno y avena después de un procesamiento hidrotérmico.

N'Dri y col., (2013) mostraron que el proceso de cocción de harina de sorgo disminuyó hasta en un 48% el contenido de fenoles totales libres, mientras que la actividad antioxidante disminuyó cerca del 75% aproximadamente. Esto Particularmente esta pérdida se puede atribuir al retiro del agua de cocción (Harakotr y col., 2014).

Se ha afirmado que el procesamiento térmico puede causar despolimerización de estructuras oligoméricas y poliméricas superiores en dímeros y trímeros, reacciones de polimerización concomitantes y formación de complejos fuertes de compuestos fenólicos solubles con macromoléculas de la matriz alimenticia, lo que puede reducir su solubilidad (Massaretto y col., 2011). Aparentemente, la liberación de compuestos fenólicos durante el proceso de cocción dependerá ampliamente de la estructura del grano.

Existe información limitada del efecto de la cocción en granos, particularmente del sorgo (N'Dri y col., 2013), y más aún, que compare el efecto de la germinación y cocción como un conjunto. Por ejemplo, en soya, el brotado por 1 a 7 días y cocción hasta por 20 minutos, redujo significativamente el contenido de fenoles totales libres, flavonoides y taninos condensados, además, de disminuir la actividad antioxidante por DPPH (31%), FRAP (34%) y ORAC (34%) (Kumari y Chang, 2016).

Además, Chandrasekara y col., (2012) y Ti y col., (2014) mencionan que el efecto perjudicial sobre los compuestos fenólicos podría estar relacionado con los flavonoides presentes en la fracción soluble de los granos enteros, o a la descarboxilación de ácidos fenólicos libres y polimerización de compuestos fenólicos.

En estudios de Fleuriet y Macheix (2003) y Xu y Chang (2008) en brotes de frutas, verduras y frijoles, cuantificaron los contenidos de ácidos fenólicos después de la ebullición. Estos autores afirman que los cambios en los brotes pudieron haber sido resultado de reacciones como: degradación por oxidación de los ácidos fenólicos, liberación de ácidos libres de las formas conjugadas, degradación de polifenoles y liberación de compuestos fenólicos unidos y la transformación de estructuras complejas de sustancias fenólicas con compuestos relacionados como proteínas, taninos y antocianinas. Además, también podrían atribuirse al aumento de la actividad de la polifenol oxidasa y otras enzimas catabólicas, que descomponen los complejos compuestos fenólicos (Kumari y Chang, 2016).

Posiblemente durante el proceso de cocción de sorgo germinado, debido a la presencia de proteínas con aminoácidos con grupos funcionales, la temperatura provocó la liberación de estos grupos funcionales, provocando un incremento en el contenido de fenoles y actividad antioxidante. Para el caso del sorgo no germinado, el aumento de fenoles libres pudo ser debido a la liberación de la fracción ligada (N'Dri y col., (2013).

CONCLUSIONES

- La optimización del proceso de germinación en sorgo mejora el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.
- El máximo contenido de ácido ferúlico en sorgo germinado se relaciona con una baja actividad de la enzima β -1,4 endoxilanasas.
- El proceso de germinación de sorgo favorece la bioaccesibilidad de ácido ferúlico.
- A partir de sorgo germinado es posible preparar un alimento con potencial funcionalidad biológica.

Por lo tanto, el proceso de germinación de sorgo, puede ser una opción de dieta saludable y contribuir a la reducción de la prevalencia de obesidad y sus comorbilidades

RECOMENDACIONES

- Profundizar en el efecto del proceso de germinación de sorgo sobre la liberación o síntesis de *novo* de ácido ferúlico.
- Estudiar algunos aspectos reológicos (viscosidad) y fisicoquímicos (absorción de agua, capacidad emulsificante, solubilidad entre otras) de las masas y harinas obtenidas a partir de sorgo germinado con el fin de formular alimentos de diseño para diferentes grupos poblacionales.
- Llevar a cabo estudios de modelación biológica de alimentos funcionales derivados de harinas de sorgo germinado.

REFERENCIAS

- AACC. American Association for Cereal Chemistry. (2008). International Board. Recuperado de: <http://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/Pages/WholeGrain.aspx> (Consultado el 21 de junio de 2019)
- Abdel-Aal, E. S. M., & Rabalski, I. (2013). Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 312-318.
- Abiko, M., Akibayashi, K., Sakata, T., Kimura, M., Kihara, M., Itoh, K., Asamizu, E., Sato, S., Takahashi, H., & Higashitani, A. (2005). High-temperature induction of male sterility during barley (*Hordeum vulgare* L.) anther development is mediated by transcriptional inhibition. *Sexual Plant Reproduction*, 18(2), 91-100.
- Adebiyi, J. A., Obadina, A. O., Adebo, O. A., & Kayitesi, E. (2017). Comparison of nutritional quality and sensory acceptability of biscuits obtained from native, fermented, and malted pearl millet (*Pennisetum glaucum*) flour. *Food chemistry*, 232, 210-217.
- Adom, K. K., Sorrells, M. E., & Liu, R. H. (2005). Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6), 2297-2306.
- Afify, A. E. M. M., El-Beltagi, H. S., El-Salam, S. M. A., & Omran, A. A. (2012a). Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E, β -carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 203-209.
- Afify, A. E. M. M., El-Beltagi, H. S., El-Salam, S. M. A., & Omran, A. A. (2012). Protein solubility, digestibility and fractionation after germination of sorghum varieties. *Plos One*, 7(2), e31154.
- Ahmad, J. (1992). The effect of sodium chloride on the physiology of cotyledons and mobilization of reserve food in *Cicer arietinum*. *Pakistan Journal of Botany*, 24, 40-48.
- Alldrick, A. J. (2010). The bakery: a potential leader in functional food applications. *Functional Foods: Some Pointers for Success*, 220.
- Alonso-Blanco, C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C. J., & Koornneef, M. (1999). Natural allelic variation at seed size loci in relation to other life history traits of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4710-4717.

- Amaya Villalva, M. F., González-Aguilar, G., Sáñez, O. R., Astiazarán García, H., Ledesma Osuna, A. I., López-Ahumada, G. A., & Robles-Sánchez, R. M. (2018). Bioprocessing of wheat (*Triticum aestivum* cv. Kronstad) bran from Northwest Mexico: Effects on ferulic acid bioaccessibility in breads. *CyTA-Journal of Food*, *16*(1), 570-579.
- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A. R., & Fait, A. (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science*, *15*(4), 211-218.
- Anson, N. M., Selinheimo, E., Havenaar, R., Aura, A. M., Mattila, I., Lehtinen, P., Bast, A., Poutanen, K., & Haenen, G. R. (2009b). Bioprocessing of wheat bran improves *in vitro* bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(14), 6148-6155.
- Anson, N. M., Van den Berg, R., Havenaar, R., Bast, A., & Haenen, G. R. (2009a). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, *49*(2), 296-300.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, *141*(2), 391-396.
- Awika, J. M., & Rooney, L. W. (2004). Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, *65*(9), 1199-1221.
- Awika, J. M., Yang, L., Browning, J. D., & Faraj, A. (2009). Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties. *LWT - Food Science and Technology*, *42*:1041-1046.
- Bacic, A. N., Harris, P. J., & Stone, B. A. (1988). Structure and function of plant cell walls. *The Biochemistry of Plants*, *14*, 297-371.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., & Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, *331*(10), 806-814.
- Balasubashini, M. S., Rukkumani, R., Viswanathan, P., & Menon, V. P. (2004). Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *18*(4), 310-314.
- Bandyopadhyay, K., Chakraborty, C., & Bhattacharyya, S. (2014). Fortification of mango peel and kernel powder in cookies formulation. *Journal of Academia and Industrial Research*, *2*(12), 661-664.
- Barnes, W. J., & Anderson, C. T. (2018). Release, recycle, rebuild: cell-wall remodeling, autodegradation, and sugar salvage for new wall biosynthesis during plant development. *Molecular Plant*, *11*(1), 31-46.

- Bartels, D., & Salamini, F. (2001). Desiccation tolerance in the resurrection *Plantcraterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology*, *127*(4), 1346-1353.
- Belton, P. S., Delgadillo, I., Halford, N. G., & Shewry, P. R. (2006). Kafirin structure and functionality. *Journal of Cereal Science*, *44*:272-286.
- Benjavongkulchai, E., & Spencer, M. S. (1986). Purification and characterization of barley-aleurone xylanase. *Planta*, *169*(3), 415-419.
- Berg, A. H., Combs, T. P., & Scherer, P. E. (2002). ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *13*(2), 84-89.
- Bergmann, H., Rogoll, D., Scheppach, W., Melcher, R., & Richling, E. (2009). The Ussing type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tight-junction genes using a colonic cell line. *Molecular nutrition & food research*, *53*(10), 1211-1225.
- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., & García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, *102*(3), 865-874.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, *9*(7), 1055.
- Bewley, J. D., & Black, M. (1994). Seeds. *In Seeds* (pp. 1-33). Springer, Boston, MA.
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, *31*(2), 118-129.
- Bih, F. Y., Wu, S. S., Ratnayake, C., Walling, L. L., Nothnagel, E. A., & Huang, A. H. (1999). The predominant protein on the surface of maize pollen is an endoxylanase synthesized by a tapetum mRNA with a long 5' leader. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(32), 22884-22894.
- Birch, C. S., & Bonwick, G. A. (2019). Ensuring the future of functional foods. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(5), 1467-1485.
- Bondia-Pons, I., Aura, A. M., Vuorela, S., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K. (2009). Rye phenolics in nutrition and health. *Journal of Cereal Science*, *49*(3), 323-336.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, *56*(11), 317-333.
- Brennan, C. S., & Cleary, L. J. (2005). The potential use of cereal (1→3, 1→4)-β-D-glucans as functional food ingredients. *Journal of Cereal Science*, *42*(1), 1-13.

- Bukhov, N. G., & Mohanty, P. (1999). Elevated temperature stress effects on photosystems: characterization and evaluation of the nature of heat induced impairments. *In Concepts in Photobiology*, (pp. 617-648). Springer, Dordrecht.
- Cardoso, L. d. M., Montini, T. A., Pinheiro, S. S., Pinheiro Sant'Ana, H. M., Martino, H. S. D., & Moreira, A. V. B. (2014). Effects of processing with dry heat and wet heat on the antioxidant profile of sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Food Chemistry*, *152*:201-217.
- Carter, L. M., & Chesson, J. H. (1996). Two USDA researchers develop a moisture seeking attachment for crop seeders that is designed to help growers plant seed in soil sufficiently moist for germination. *Seed World*, *134*, 14-15.
- Caspers, M. P., Lok, F., Sinjorgo, K. M., Van Zeijl, M. J., Nielsen, K. A., & Cameron-Mills, V. (2001). Synthesis, processing and export of cytoplasmic endo- β -1, 4-xylanase from barley aleurone during germination. *The Plant Journal*, *26*(2), 191-204.
- Castelluccio, C., Paganga, G., Melikian, N., Bolwell, G. P., Pridham, J., Sampson, J., & Rice-Evans, C. (1995). Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters*, *368*(1), 188-192.
- Cecchini, M., Sassi, F., Lauer, J. A., Lee, Y. Y., Guajardo-Barron, V., & Chisholm, D. (2010). Tackling of unhealthy diets, physical inactivity, and obesity: health effects and cost-effectiveness. *The Lancet*, *376*(9754), 1775-1784.
- Chandrasekara, A., Naczek, M., & Shahidi, F. (2012). Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains. *Food Chemistry*, *133*(1), 1-9.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, *79*(1-2), 131-141.
- Chauhan, A., Saxena, D. C., & Singh, S. (2015). Total dietary fibre and antioxidant activity of gluten free cookies made from raw and germinated amaranth (*Amaranthus* spp.) flour. *LWT-Food Science and Technology*, *63*(2), 939-945
- Chavarín-Martínez, C. D., Gutiérrez-Dorado, R., Perales-Sánchez, J. X. K., Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., & Reyes-Moreno, C. (2019). Germination in Optimal Conditions as Effective Strategy to Improve Nutritional and Nutraceutical Value of Underutilized Mexican Blue Maize Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, *74*(2), 192-199.
- Chiremba, C., Taylor, J. R. N., Rooney, L. W., & Beta, T. (2012). Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. *Food Chemistry*, *134*:81-88.

- Chiwocha, S. D., Cutler, A. J., Abrams, S. R., Ambrose, S. J., Yang, J., Ross, A. R., & Kermode, A. R. (2005). The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *The Plant Journal*, *42*(1), 35-48.
- Cilla, A., Bosch, L., Barberá, R., & Alegría, A. (2018). Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds—a review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, *68*, 3-15.
- Clydesdale, F. M. (1999). ILSI North America Technical Committee on Food Components for Health Promotion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *39*(3), 203-316.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(1), 3-23.
- Corder, A. M., & Henry, R. J. (1989). Carbohydrate-degrading enzymes in germinating wheat. *Cereal Chem*, *66*(5), 435-439.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(11), 850.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, *223*(4637), 701-703.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., & Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, *54*(1), 579-599.
- Czubinski, J., Dwiecki, K., Siger, A., Neunert, G., & Lampart-Szczapa, E. (2014). Characterisation of different digestion susceptibility of lupin seed globulins. *Food Chemistry*, *143*, 418-426.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scaccocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1321-1342.
- de Git, K. C. G., & Adan, R. A. H. (2015). Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obesity Reviews*, *16*(3), 207-224.
- De Morais Cardoso, L., Pinheiro, S. S., de Carvalho, C. W. P., Queiroz, V. A. V., de Menezes, C. B., Moreira, A. V. B., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2015). Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven. *Journal of Cereal Science*, *65*, 220-226.
- Debeaujon, I., & Koornneef, M. (2000). Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology*, *122*(2), 415-424.

- d'Errico, C., Jørgensen, J. O., Krogh, K. B., Spodsberg, N., Madsen, R., & Monrad, R. N. (2015). Enzymatic degradation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs): Model studies using a fungal glucuronoyl esterase from *Cerrena unicolor*. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(5), 914-922.
- Dicko, M. H., Gruppen, H., Traoré, A. S., van Berkel, W. J., & Voragen, A. G. (2005). Evaluation of the effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activities in sorghum varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(7), 2581-2588.
- Dicko, M. H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Traoré, A. S., Laane, C., van Berkel, W. J., & Voragen, A. G. (2002). Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol oxidase, and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(13), 3780-3788.
- Dlamini, N. R., Taylor, J. R., & Rooney, L. W. (2007). The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods. *Food Chemistry*, *105*(4), 1412-1419.
- Domínguez-Avila, J. A., Wall-Medrano, A., Velderrain-Rodríguez, G. R., Chen, C. Y. O., Salazar-López, N. J., Robles-Sanchez, M., & González-Aguilar, G. A. (2017). Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food & Function*, *8*(1), 15-38.
- Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., y Vasiljevic, T. (2012). Germinated grains—Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, *135*(3), 950-959.
- Dornez, E., Gebruers, K., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2009). Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing. *Trends in food Science & Technology*, *20*(11-12), 495-510.
- Du, X., Pérez-Boada, M., Fernández, C., Rencoret, J., José, C., Jiménez-Barbero, J. & Martínez, A. T. (2014). Analysis of lignin–carbohydrate and lignin–lignin linkages after hydrolase treatment of xylan–lignin, glucomannan–lignin and glucan–lignin complexes from spruce wood. *Planta*, *239*(5), 1079-1090.
- Duodu, K. G., Taylor, J. R. N., Belton, P. S., & Hamaker, B. R. (2003). Factors affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Science*, *38*(2), 117-131.
- Dykes, L., & Rooney, L. W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science*, *44*(3), 236-251.
- Dykes, L., Seitz, L. M., Rooney, W. L., & Rooney, L. W. (2009). Flavonoid composition of red sorghum genotypes. *Food Chemistry*, *116*(1), 313-317.
- El-Maarouf-Bouteau, H., & Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, *3*(3), 175-182.

- Edge, M. S., Jones, J. M., & Marquart, L. (2005). A new life for whole grains. *Journal of the American Dietetic Association*, 105(12), 1856-1860.
- ENSANUT, Encuesta Nacional de Salud a medio camino (2016). Informe final de resultados. Recuperado de: http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf (Fecha de acceso: 5 de diciembre del 2017)
- Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A. M., Napolitano, A., Vitale, D., & Fogliano, V. (2005). Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Research International*, 38(10), 1167-1173.
- Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A. R., & Galili, G. (2006). Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, 142(3), 839-854.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1997). La Economía del Sorgo y del Mijo en el Mundo: Hechos, Tendencias y Perspectivas, Recuperado de <http://www.fao.org/3/w1808s/w1808s00.htm#Contents> (Consultado el 1 junio de 2019)
- Farrar, J. L., Hartle, D. K., Hargrove, J. L., & Greenspan, P. (2008). A novel nutraceutical property of select sorghum (*Sorghum bicolor*) brans: inhibition of protein glycation. *Phytotherapy Research*, 22:1052-1056.
- Fincher, G. B. (1986). Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in Cereal Science and Technology*, 8, 207-295.
- Fincher, G. B. (1989). Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Biology*, 40(1), 305-346.
- Fincher, G. B. (1992). Cell wall metabolism in barley. *Biotechnology in Agriculture*.
- Fincher, G. B., & Shewry, P. R. (1992). Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. *CAB International, Wallingford*
- FIRA, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (2016). Panorama agroalimentario del sorgo, México. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200640/Panorama_Agroalimentario_Sorgo_2016.pdf (Fecha de acceso: 1 de septiembre de 2017)
- Fleuriet, A., & Macheix, J.J. (2003). Phenolic acids in fruits and vegetables. In: CA Rice-Evans & L Packer editors. *Oxidative Stress and Disease*, New York: Marcel Dekker Inc. p 1– 42.

- Flight, I., & Clifton, P. (2006). Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(10), 1145.
- Foolad, M. R. (1999). Comparison of salt tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato by QTL mapping. *Genome*, 42(4), 727-734.
- Franková, L., & Fry, S. C. (2013). Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides. *Journal of Experimental Botany*, 64(12), 3519-3550.
- Fry, S. C. (1988). The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. *Longman Group Limited*.
- Gan, R. Y., Lui, W. Y., Wu, K., Chan, C. L., Dai, S. H., Sui, Z. Q., & Corke, H. (2017). Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 1-14.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Ginsburg, I., Koren, E., Shalish, M., Kanner, J., & Kohen, R. (2012). Saliva increases the availability of lipophilic polyphenols as antioxidants and enhances their retention in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 57(10), 1327-1334.
- Glennie, C. W. (1983). Polyphenol changes in sorghum grain during malting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(6), 1295-1299.
- Gorelik, S., Lapidot, T., Shaham, I., Granit, R., Ligumsky, M., Kohen, R., & Kanner, J. (2005). Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3397-3402.
- Green, R. J., Murphy, A. S., Schulz, B., Watkins, B. A., & Ferruzzi, M. G. (2007). Common tea formulations modulate *in vitro* digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(9), 1152-1162.
- Gross, G. G. (1985). Biosynthesis and metabolism of phenolic acids and monolignols (pp. 229-271). *Academic Press: Orlando, FL*.
- Gumienna, M., Lasik, M., & Czarnecki, Z. (2011). Bioconversion of grape and chokeberry wine polyphenols during simulated gastrointestinal *in vitro* digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(3), 226-233.
- Guo, W., & Beta, T. (2013). Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals. *Food Research International*, 51(2), 518-525.

- Guzmán-Ortiz, F. A., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Mora-Escobedo, R., Rojas-León, A., Rodríguez-Marín, M. L., & Román-Gutiérrez, A. D. (2019). Enzyme activity during germination of different cereals: A review. *Food Reviews International*, 35(3), 177-200.
- Hannah, M. A., Wiese, D., Freund, S., Fiehn, O., Heyer, A. G., & Hinch, D. K. (2006). Natural genetic variation of freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142(1), 98-112.
- Harakotr, B., Suriharn, B., Tangwongchai, R., Scott, M. P., & Lertrat, K. (2014). Anthocyanin, phenolics and antioxidant activity changes in purple waxy corn as affected by traditional cooking. *Food Chemistry*, 164, 510-517.
- Hasler, C. M. (1998). Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food technology Champaign Then Chicago*, 52, 63-147.
- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., & Abecassis, J. (2007). Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 327-347.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280(2), 309-316.
- Hermann, K., Meinhard, J., Dobrev, P., Linkies, A., Pesek, B., Heß, B., & Leubner-Metzger, G. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): a comparative study of fruits and seeds. *Journal of Experimental Botany*, 58(11), 3047-3060.
- Hill, J. O., & Peters, J. C. (1998). Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science*, 280(5368), 1371-1374.
- Hithamani, G., & Srinivasan, K. (2014a). Effect of domestic processing on the polyphenol content and bioaccessibility in finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Food Chemistry*, 164, 55-62.
- Hithamani, G., & Srinivasan, K. (2014b). Bioaccessibility of polyphenols from wheat (*Triticum aestivum*), sorghum (*Sorghum bicolor*), green gram (*Vigna radiata*), and chickpea (*Cicer arietinum*) as influenced by domestic food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(46), 11170-11179.
- Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., & Sahlstrøm, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25), 6369-6375.
- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, J., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., & Horemans, N. (2006). Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in

- photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry*, 67(12), 1185-1195.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., & Spiegelman, B.M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259:87–91.
- Hubbard, J. E., Hall, H. H., & Earle, F. R. (1950). Composition of the component parts of the sorghum kernel. *Cereal Chemistry*, 27, 415-420.
- Hübner, F., Schehl, B. D., Gebruers, K., Courtin, C. M., Delcour, J. A., & Arendt, E. K. (2010). Influence of germination time and temperature on the properties of rye malt and rye malt based worts. *Journal of Cereal Science*, 52(1), 72-79.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12.
- Hwang, K. T., Cuppett, S. L., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2002). Properties, composition, and analysis of grain sorghum wax. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(6), 521-527.
- Iba, K. (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 225-245.
- Jakobek, L. (2015) Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem*, 175:556–567
- Jha, D., Shirley, N., Tester, M., & Roy, S. J. (2010). Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in *Arabidopsis* ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. *Plant, Cell & Environment*, 33(5), 793-804.
- Jones, J. M., Reicks, M., Adams, J., Fulcher, G., Weaver, G., Kanter, M., & Marquart, L. (2002). The importance of promoting a whole grain foods message. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(4), 293-297.
- Jood, S., Chauhan, B. M., & Kapoor, A. C. (1987). Polyphenols of chickpea and blackgram as affected by domestic processing and cooking methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 39(2), 145-149.
- Kamath, V., Niketh, S., Chandrashekar, A., & Rajini, P. S. (2007). Chymotryptic hydrolysates of α -kafirin, the storage protein of sorghum (*Sorghum bicolor*) exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activity. *Food Chemistry*, 100:306-311.
- Kaukovirta-Norja, A., Wilhelmson, A., & Poutanen, K. (2004). Germination: a means to improve the functionality of oat.

- Khan, M. A., & Rizvi, Y. (1994). Effect of salinity, temperature, and growth regulators on the germination and early seedling growth of *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Canadian Journal of Botany*, 72(4), 475-479.
- Kim, H. Y., Hwang, I. G., Kim, T. M., Woo, K. S., Park, D. S., Kim, J. H., Kim, D. J., Lee, J., Lee, Y. R., & Jeong, H. S. (2012). Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. *Food Chemistry*, 134, 288–293.
- Kim, J., & Park, Y. (2012). Anti-diabetic effect of sorghum extract on hepatic gluconeogenesis of streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition & Metabolism* 9:1-7.
- Kołodziejczyk, P., & Michniewicz, J. (2004). The changes of some enzyme's activities during germination of rye kernels. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 7(1).
- Kranner, I., Beckett, R. P., Wornik, S., Zorn, M., & Pfeifhofer, H. W. (2002). Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *The Plant Journal*, 31(1), 13-24.
- Kruma, Z., Kince, T., Galoburda, R., Tomsone, L., Straumite, E., Sabovics, M., ... & Kronberga, A. (2019). Influence of germination temperature and time on phenolic content and antioxidant properties of cereals. In *Baltic Conference on Food Science and Technology: Conference Proceedings*. LLU.
- Kulawinek, M., Jaromin, A., & Kozubek, A. (2007). Mechanizmy działania składników pełnych ziaren zbóż. *Lek w Polsce*, 17(2), 85-96.
- Kumari, S., & Chang, S. K. (2016). Effect of cooking on isoflavones, phenolic acids, and antioxidant activity in sprouts of prosoy soybean (*glycine max*). *Journal of Food Science*, 81(7), C1679-C1691.
- Laserna, M. P., Sánchez, R. A., & Botto, J. F. (2008). Light-related Loci Controlling Seed Germination in *L. erx Cvi* and *Bay-0x Sha* Recombinant Inbred-line Populations of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 102(4), 631-642.
- Linkies, A., Müller, K., Morris, K., Turečková, V., Wenk, M., Cadman, C. S., & Leubner-Metzger, G. (2009). Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(12), 3803-3822.
- Liukkonen, K. H., Katina, K., Wilhelmsson, A., Myllymaki, O., Lampi, A. M., Kariluoto, S., & Peltoketo, A. (2003). Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 117-122.

- Logan, D. C., Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Hill, S. A., & Leaver, C. J. (2001). Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiology*, 125(2), 662-672.
- Lorrain, B., Dangles, O., Genot, C., & Dufour, C. (2009). Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 676-683.
- Lorrain, B., Dangles, O., Loonis, M., Armand, M., & Dufour, C. (2012). Dietary iron-initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphenols in gastric conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9074-9081.
- Lu, Y., & Bennick, A. (1998). Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of oral biology*, 43(9), 717-728.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139-158.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81:230S-242S.
- Mangan, D., Cornaggia, C., Liadova, A., Draga, A., Ivory, R., Evans, D. E., & McCleary, B. V. (2018). Development of an automatable method for the measurement of endo-1, 4- β -xylanase activity in barley malt and initial investigation into the relationship between endo-1, 4- β -xylanase activity and wort viscosity. *Journal of Cereal Science*, 84, 90-94.
- Martins, Z. E., Pinho, O., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2017). Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 106-128.
- Massaretto, I. L., Alves, M. F. M., de Mira, N. V. M., Carmona, A. K., & Marquez, U. M. L. (2011). Phenolic compounds in raw and cooked rice (*Oryza sativa* L.) and their inhibitory effect on the activity of angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Cereal Science*, 54(2), 236-240.
- Mathew, S., & Abraham, T. E. (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(2-3), 59-83.
- Matilla, A. J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. *Fundamentos de fisiología vegetal*, 2, 549.
- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005b). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5896-5904.

- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005a). Anthocyanins from red wine—their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66(21), 2540-2548.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage—stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68(9), 1285-1294.
- MEGAZYME. (2018). endo-Xylanase Assay Kit (XylX6 Method). Wicklow, Irlanda. Recuperado de: <https://secure.megazyme.com/endo-Xylanase-Assay-Kit-XylX6-Method>
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Harborne, J. (1993). The flavonoids: advances in research since 1986. *Chapman & Hall/CRC*, New York.
- Minic, Z. (2008). Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*, 227(4), 723.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1), 561-591.
- Montgomery, D. C., & Myers, R. H. (1995). Response surface methodology. Design and Analysis of Experiments, 445-474.
- Moongngarm, A., & Saetung, N. (2010). Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chemistry*, 122, 782–788.
- Moore, A. I., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2005). Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51(3), 241-249.
- Moraes, É. A., Natal, D. I. G., Queiroz, V. A. V., Schaffert, R. E., Cecon, P. R., de Paula, S. O., Benjamim, L. d. A., Ribeiro, S. M. R., & Martino, H. S. D. (2012). Sorghum genotype may reduce low-grade inflammatory response and oxidative stress and maintains jejunum morphology of rats fed a hyperlipidic diet. *Food Research International* 49:553-559.
- Moreno, E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. UNAM.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 239-250.
- Munz, E., Rolletschek, H., Oeltze-Jafra, S., Fuchs, J., Guendel, A., Neuberger, T., & Borisjuk, L. (2017). A functional imaging study of germinating oilseed rape seed. *New Phytologist*, 216(4), 1181-1190.

- Muriu, J. I., Njoka-Njiru, E. N., Tuitoek, J. K., & Nanua, J. N. (2002). Evaluation of sorghum (*Sorghum bicolor*) as replacement for maize in the diet of growing rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 15:565-569.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., & Nambara, E. (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *The plant journal*, 41(5), 697-709.
- N'Dri, D., Mazzeo, T., Zaupa, M., Ferracane, R., Fogliano, V., & Pellegrini, N. (2013). Effect of cooking on the total antioxidant capacity and phenolic profile of some whole-meal African cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 29-36.
- NHMCR. National Health and Medical Research Council (2013) Australian Dietary Guidelines. Canberra, Australia: National Health and Medical Research Council (NHMRC).
- Nicoletti, I., Martini, D., De Rossi, A., Taddei, F., D'Egidio, M. G., & Corradini, D. (2013). Identification and quantification of soluble free, soluble conjugated, and insoluble bound phenolic acids in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) and derived products by RP-HPLC on a semimicro separation scale. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(48), 11800-11807.
- Nonogaki, H., Bassel, G. W., & Bewley, J. D. (2010). Germination—still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574-581.
- Nonogaki, H., Chen, F., & Bradford, K. J. (2018). Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. *Annual Plant Reviews Online*, 264-304.
- Nwanguma, B. C., & Eze, M. O. (1996). Changes in the concentrations of the polyphenolic constituents of sorghum during malting and mashing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(2), 162-166.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., & Yamaguchi, S. (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell*, 15(7), 1591-1604.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2017). *Obesidad y Sobrepeso*. Ginebra, Suiza. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Ötles, S., & Cagindi, Ö. (2006). Cereal based functional foods and nutraceuticals. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 5(1), 107-112.
- Pajak, P., Socha, R., Galkowska, D., Roznowski, J., & Fortuna, T. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 143, 300e306.

- Parr, A. J., & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 985-1012.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N., & Flagella, Z. (2007). Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: a case study: durum wheat mitochondria. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 195-210.
- Paucar-Menacho, L. M., Martinez-Villaluenga, C., Dueñas, M., Frias, J., & Peñas, E. (2017a). Optimization of germination time and temperature to maximize the content of bioactive compounds and the antioxidant activity of purple corn (*Zea mays* L.) by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 236-244.
- Paucar-Menacho, L. M., Peñas, E., Dueñas, M., Frias, J., & Martinez-Villaluenga, C. (2017b). Optimizing germination conditions to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 245-252.
- Pedersen, M. B., Bunzel, M., Schäfer, J., Knudsen, K. E. B., Sørensen, J. F., Yu, S., & Lærke, H. N. (2015). Ferulic acid dehydrodimer and dehydrotrimer profiles of distiller's dried grains with solubles from different cereal species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 2006-2012.
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Fernández-López, J., Ricci, A., Pérez-Álvarez, J. A., Sterzo, C. L., & Viuda-Martos, M. (2017). Bioaccessibility of polyphenolic compounds of six quinoa seeds during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 38, 77-88.
- Peñas, E., Gomez, R., Frías, J., & Vidal-Valverde, C. (2008). Application of high-pressure treatment on alfalfa (*Medicago sativa*) and mung bean (*Vigna radiata*) seeds to enhance the microbiological safety of their sprouts. *Food Control*, 19(7), 698-705.
- Penfield, S. (2017). Revealing the water uptake pathways of seeds with high resolution magnetic resonance imaging. *New Phytologist*, 216(4), 965-966.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., & García-Viguera, C. (2002). *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.
- Phan, A. D. T., Netzel, G., Wang, D., Flanagan, B. M., D'Arcy, B. R., & Gidley, M. J. (2015). Binding of dietary polyphenols to cellulose: Structural and nutritional aspects. *Food chemistry*, 171, 388-396.

- Poutanen, K. (2006). Oat and beta-glucan—Healthy solutions for consumers. In Functional Food Network General Meeting.
- Preece, I. A., & MacDougall, M. (1958). Enzymic degradation of cereal hemicelluloses ii. pattern of pentosan degradation. *Journal of the Institute of Brewing*, 64(6), 489-500.
- Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y., & Nambara, E. (2009). Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant and Cell Physiology*, 50(10), 1786-1800.
- Prinz, J. F., & Lucas, P. W. (2000). Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation*, 27(11), 991-994.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Quirós-Sauceda, A. E., Ayala-Zavala, J. F., Sáyago-Ayerdi, S. G., Vélez-de La Rocha, R., Sañudo-Barajas, A., & González-Aguilar, G. A. (2014). Added dietary fiber reduces the antioxidant capacity of phenolic compounds extracted from tropical fruit. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87.
- Ragaei, S., Abdel-Aal, E. S. M., & Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*, 98(1), 32-38.
- Rajjou, L., & Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10), 796-805.
- Ramadan, B. R., Sorour, M. A., & Kelany, M. A. (2012). Changes in total phenolics and DPPH scavenging activity during domestic processing in some cereal grains. *Annals. Food Science and Technology*, 13, 190-196.
- Ramakrishna, R., Sarkar, D., Manduri, A., Iyer, S. G., & Shetty, K. (2017). Improving phenolic bioactive-linked anti-hyperglycemic functions of dark germinated barley sprouts (*Hordeum vulgare* L.) using seed elicitation strategy. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3666-3678.
- Rao, S., Reddy, B. V., Nagaraj, N., & Upadhyaya, H. D. (2014). Sorghum production for diversified uses. Genetics, genomics and breeding of Sorghum. CRC Press, FL, 1-27.
- Rawel, H. M., Frey, S. K., Meidtner, K., Kroll, J., & Schweigert, F. J. (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular Nutrition & food Research*, 50(8), 705-713.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1660S-1664S.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 147-176.
- Sagasser, M., Lu, G. H., Hahlbrock, K., & Weisshaar, B. (2002). A. thaliana TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Genes & Development*, 16(1), 138-149.
- Sahyoun, N. R., Jacques, P. F., Zhang, X. L., Juan, W., & McKeown, N. M. (2006). Whole-grain intake is inversely associated with the metabolic syndrome and mortality in older adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(1), 124-131.
- Salazar-López, N. J., González-Aguilar, G. A., Rouzaud-Sáñez, O., & Robles-Sánchez, M. (2018). Bioaccessibility of hydroxycinnamic acids and antioxidant capacity from sorghum bran thermally processed during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2021-2030.
- Salazar-Lopez, N. J., Loarca-Piña, G., Campos-Vega, R., Gaytán Martínez, M., Morales Sánchez, E., Esquerra-Brauer, J. M., & Robles Sánchez, M. (2016). The extrusion process as an alternative for improving the biological potential of sorghum bran: phenolic compounds and antiradical and anti-inflammatory capacity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185-194.
- Santiago, R., & Malvar, R. (2010). Role of dehydrodiferulates in maize resistance to pests and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 691-703.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., & Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. *In Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. IntechOpen.
- Sattler, S. E., Gilliland, L. U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., & DellaPenna, D. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The plant Cell*, 16(6), 1419-1432.

- Saulnier, L., & Thibault, J. F. (1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 396-402.
- Saura-Calixto, F. (2010). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43-49.
- Sautier, D., O'Deyes, M., Bricas, N., O'Deye, M., Faure, J., & Muchnik, J. (1989). Mil, maïs, sorgho. *Techniques et Alimentation au Sahel. L'harmattan*.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G., & Yamaguchi, S. (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 463.
- Serrano, F. R. T., & Cadenas, A. G. (2008). Fisiología de las plantas y el estrés. In *Fundamentos de fisiología vegetal (577-597)*. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Shahidi, F., & Naczki, M. (1995). Methods of analysis and quantification of phenolic compounds. Food phenolic: *Sources, Chemistry, Effects and Applications*, 287-293.
- Shetty, K. (2004). Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review. *Process Biochemistry*, 39(7), 789-804.
- Shih, C.-H., Siu, Ng, R., Wong, E., Chiu, L. C. M., Chu, I. K., & Lo, C. (2007). Quantitative analysis of anticancer 3-deoxyanthocyanidins in infected sorghum seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:254-259.
- Simpson, D. J., Fincher, G. B., Huang, A. H., & Cameron-Mills, V. (2003). Structure and function of cereal and related higher plant (1→ 4)- β -xylan endohydrolases. *Journal of Cereal Science*, 37(2), 111-127.
- Singh, J., Sastry, E. D., & Singh, V. (2012). Effect of salinity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during seed germination stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(1), 45-50.
- Slade, A. M., Høj, P. B., Morrice, N. A., & Fincher, G. B. (1989). Purification and characterization of three (1→ 4) - β -d-xylan endohydrolases from germinated barley. *European Journal of Biochemistry*, 185(3), 533-539.
- Slavin, J, Jacobs, D, Marquart, L (2001) Grain processing and nutrition. *Critical Reviews in Biotechnology* 21(1): 49–66.
- Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2007). Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α -amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6726-6735.

- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., ... & Vorwerk, S. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306(5705), 2206-2211.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1-2), 200-213.
- Souza, A. E., Araújo, E., & Nascimento, L. C. (2007). Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. *Fitopatologia Brasileira*, 32(6), 465-471.
- Stefoska-Needham, A., Beck, E. J., Johnson, S. K., & Tapsell, L. C. (2015). Sorghum: an underutilized cereal whole grain with the potential to assist in the prevention of chronic disease. *Food Reviews International*, 31(4), 401-437.
- Subramanian, V., Murty, D. S., Rao, N. S., & Jambunathan, R. (1992). Chemical changes and diastatic activity in grains of sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars during germination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58(1), 35-40.
- Subramaniyan, S., & Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 33-64.
- Sun, L., Chen, W., Meng, Y., Yang, X., Yuan, L., & Guo, Y. (2016). Interactions between polyphenols in thinned young apples and porcine pancreatic α -amylase: Inhibition, detailed kinetics and fluorescence quenching. *Food chemistry*, 208, 51-60.
- Sunna, A., & Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical reviews in biotechnology*, 17(1), 39-67.
- Suzuki, M., Kato, A., Nagata, N., & Komeda, Y. (2002). A xylanase, AtXyn1, is predominantly expressed in vascular bundles, and four putative xylanase genes were identified in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant and Cell Physiology*, 43(7), 759-767.
- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D. L., Schieber, A., & Ganzle, M. G. (2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9214-9220.
- Swinburn, B. A., Caterson, I., Seidell, J. C., & James, W. P. T. (2004). Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public Health Nutrition*, 7(1a), 123-146.
- Taiz, L. (1998). Plant defenses: surface protection and secondary metabolites In: TAIZ L; ZEIGER E. *Plant Physiology*, 350-353.

- Taiz, L., & Honigman, W. A. (1976). Production of cell wall hydrolyzing enzymes by barley aleurone layers in response to gibberellic acid. *Plant Physiology*, 58(3), 380-386.
- Taylor, J. R., & Duodu, K. G. (2015). Effects of processing sorghum and millets on their phenolic phytochemicals and the implications of this to the health-enhancing properties of sorghum and millet food and beverage products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(2), 225-237.
- Taylor, J. R., Schober, T. J., & Bean, S. R. (2006). Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *Journal of Cereal Science*, 44(3), 252-271.
- Tesfay, S. Z., Modi, A. T., & Mohammed, F. (2016). The effect of temperature in moringa seed phytochemical compounds and carbohydrate mobilization. *South African Journal of Botany*, 102, 190-196.
- Thomson, C., Bloch, A. S., Hasler, C. M., Kubena, K., Earl, R., & Heins, J. (1999). Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(10), 1278-1285.
- Ti, H., Zhang, R., Li, Q., Wei, Z., & Zhang, M. (2015). Effects of cooking and *in vitro* digestion of rice on phenolic profiles and antioxidant activity. *Food Research International*, 76, 813-820.
- Towo, E. E., Svanberg, U., & Ndossi, G. D. (2003). Effect of grain pre-treatment on different extractable phenolic groups in cereals and legumes commonly consumed in Tanzania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(9), 980-986.
- Towo, E., Matuschek, E., & Svanberg, U. (2006). Fermentation and enzyme treatment of tannin sorghum gruels: effects on phenolic compounds, phytate and *in vitro* accessible iron. *Food Chemistry*, 94(3), 369-376.
- USDA. World Agricultural Supply and Demand Estimates (WASDE). December 9th, 2016
- Van Campenhout, S., & Volckaert, G. (2005). Differential expression of endo- β -1, 4-xylanase isoenzymes XI and X-II at various stages throughout barley development. *Plant science*, 169(3), 512-522.
- Van Campenhout, S., Pollet, A., Bourgois, T. M., Rombouts, S., Beaugrand, J., Gebruers, K., ... & Volckaert, G. (2007). Unprocessed barley aleurone endo- β -1, 4-xylanase XI is an active enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(3), 799-804.
- Venn, B. J., & Mann, J. I. (2004). Cereal grains, legumes and diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(11), 1443.

- Vogel, J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 301-307.
- Voiniciuc, C., Pauly, M., & Usadel, B. (2018). Monitoring Polysaccharide Dynamics in the Plant Cell Wall. *Plant Physiology*, 176(4), 2590-2600.
- Wahid, A., & Ghazanfar, A. (2006). Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology*, 163(7), 723-730.
- Wang, T., He, F., & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7, 101-111.
- Whittaker, A., Martinelli, T., Bochicchio, A., Vazzana, C., & Farrant, J. (2004). Comparison of sucrose metabolism during the rehydration of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive leaf material of *Sporobolus stapfianus*. *Physiologia Plantarum*, 122(1), 11-20.
- Williams, P. G., Grafenauer, S. J., & O'Shea, J. E. (2008). Cereal grains, legumes, and weight management: a comprehensive review of the scientific evidence. *Nutrition Reviews*, 66(4), 171-182.
- Wolkers, W. F., Walker, N. J., Tablin, F., & Crowe, J. H. (2001). Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology*, 42(2), 79-87.
- Woo, H. J., Oh, I. T., Lee, J. Y., Jun, D. Y., Seu, M. C., Woo, K. S., Nam, M. H., & Kim, Y. H. (2012). Apigeninidin induces apoptosis through activation of Bak and Bax and subsequent mediation of mitochondrial damage in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Process Biochemistry* 47:1861-1871.
- Wu, L., Huang, Z., Qin, P., & Ren, G. (2013a). Effects of processing on phytochemical profiles and biological activities for production of sorghum tea. *Food Research International*, 53(2), 678-685.
- Wu, S. S., Suen, D. F., Chang, H. C., & Huang, A. H. (2002). Maize tapetum xylanase is synthesized as a precursor, processed and activated by a serine protease, and deposited on the pollen. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 49055-49064.
- Xia, Q., Wang, L., Xu, C., Mei, J., & Li, Y. (2017). Effects of germination and high hydrostatic pressure processing on mineral elements, amino acids and antioxidants *in vitro* bioaccessibility, as well as starch digestibility in brown rice (*Oryza sativa* L.). *Food Chemistry*, 214, 533-542.
- Xu, B., & Chang, S. K. (2008). Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. *Food Chemistry*, 110(1), 1-13.

- Yang, F., Basu, T. K., & Oraikul, B. (2001). Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 319–330.
- Yang, L., Browning, J. D., & Awika, J. M. (2009). Sorghum 3-deoxyanthocyanins possess strong phase II enzyme inducer activity and cancer cell growth inhibition properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:1797-1804.
- Zaroug, M., Orhan, I. E., Senol, F. S., y Yagi, S. (2014). Comparative antioxidant activity appraisal of traditional Sudanese kisra prepared from two sorghum cultivars. *Food Chemistry*, 156, 110-116.
- Zeng, H. J., Liang, H. L., You, J., & Qu, L. B. (2014). Study on the binding of chlorogenic acid to pepsin by spectral and molecular docking. *Luminescence*, 29(7), 715-721.
- Zhang, Z., Smith, C., & Li, W. (2014). Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: A critical review. *Food Research International*, 65, 423-436.
- Zhao, Z., y Moghadasian, M.H. (2009). Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and *in vitro* studies. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 133-145.
- Zhou, K., Laux, J. J., & Yu, L. (2004). Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1118-1123.
- Zielinski, H., Kozłowska, H., & Lewczuk, B. (2001). Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(3), 159-169.
- Žilić, S., Basić, Z., Hadži-Tašković Šukalović, V., Maksimović, V., Janković, M., & Filipović, M. (2014). Can the sprouting process applied to wheat improve the contents of vitamins and phenolic compounds and antioxidant capacity of the flour?. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(4), 1040-1047.